目　　次

		責任者		
１）	ABI 473A 気相プロテインシーケンサー	庄司省三	・・・・・・	1
２）	超遠心分離機	中山　仁	・・・・・・	10
３）	元素分析装置	白木邦子	・・・・・・	16
４）	粉末Ｘ線回折装置	平山文俊	・・・・・・	20
５）	単結晶Ｘ線解析装置	衞藤　仁	・・・・・・	24
６）	核磁気共鳴装置（270・400・500 MHz）	矢原正治	・・・・・・	37
７）	核磁気共鳴装置（300 MHz）	矢原正治	・・・・・・	45
８）	原子吸光分析装置	城戸　裕	・・・・・・	51
９）	電子スピン共鳴装置	黒崎博雅	・・・・・・	56
１０）	フーリエ変換赤外分光光度計	田中栄緒	・・・・・・	67
１１）	セクター型質量分析装置	入口利之	・・・・・・	75
１２）	ガスクロマト質量分析計	末永綾香	・・・・・・	80
１３）	液体クロマトグラフ直結質量分析装置	入江徹美	・・・・・・	88
１４）	レーザーイオン化質量分析計	三隅将吾	・・・・・・	94
１５）	示差走査熱量測定装置	平山文俊	・・・・・・	109
１６）	断熱型示差走査熱量測定装置	平山文俊	・・・・・・	114
１７）	走査型電子顕微鏡	城戸　裕	・・・・・・	118
１８）	共焦点レーザー生物顕微鏡	高濱和夫	・・・・・・	122
１９）	画像解析装置	中山　仁	・・・・・・	130
２０）	ピコ秒蛍光寿命測定装置	今井輝子	・・・・・・	136
２１）	円二色性分散計	今井輝子	・・・・・・	141
２２）	ストップトフロー分光光度計	森　弘正	・・・・・・	147

ABI 473A気相プロテインシーケンサー
（PERKIN ELMER 473A）

薬学部　生化学研究室　庄司省三；内線 4362
古石和親；内線 4363

§１　はじめに

タンパク質やペプチドのアミノ末端からフェニルイソチオシアネート（PITC）を用いてアミノ酸を１残基づつ段階的に切り離す方法がEdmanにより確立され（図），続いてその方法の自動化が報告された．シークエンサーの最大の問題点であった抽出溶媒による試料ペプチドの流出には，種々改良の努力が払われ，ポリブレンの利用により飛躍的に改良された．

ポリブレンは多価第四級アミン高分子化合物で，負に荷電しているガラス容器表面とエドマン法の条件下で負に荷電する傾向を持つ試料ペプチドとの間の糊の役目をはたし，反応系から抽出溶媒によるペプチドの流出防止に著しい効果を持つ．微量試料を扱うことを目的とした気相法の自動装置は，Fraenkel-Conratが１９４５年に手動エドマン法の一つとして発表したものに端を発し，Schroederその他のグループで検討されたものの自動化に成功したもので，ポリブレンで覆ったガラス繊維濾紙に試料を保持させ，気体として供給される揮発性塩基（トリメチルアミン）によりpHを維持してフェニルチオカルバモイル（PTC）化を行い，環化切断にはトリフルオロ酢酸の蒸気を利用した．
反応を行うカートリッジの容量が小さいことと，反応をガラス繊維濾紙の上で行っているため，過剰試薬や反応副生成物の除去が容易で，試薬及び溶媒の使用量が少ない．
アニリノチアゾリノン（ATZ）からPTHへの自動転換装置も内蔵され，PTH-アミノ酸同定用のHPLCを直結して比較的不安定なPTH-アミノ酸の同定も容易にした．

§２　原理

2.1　理論

エドマン分解法は図に示したようにpH ９～１０でアミノ基にPITCを付加し，生成したペプチドのPTC誘導体をトリフルオロ酢酸で処理することにより環化して切断，遊離したアミノ酸のATZ誘導体を抽出し，より安定なPTH誘導体に転換して同定する．残ったペプチドはさらに反応を繰り返す．付加（PTC化）反応にはPITCを５％ヘプタン溶液として用い，溶媒を気化除去する．気化した揮発性塩基（１２．５％トリメチルアミン）を送って，ペプチドのアミノ基のイオン化を抑制し反応を開始する．
通常この付加反応は２～３回繰り返し完全PTC化を期す．付加反応には大過剰の試薬を用いるので過剰の試薬と副生成物（主としてジフェニルチオ尿素，DPTU）を酢酸

エチルで抽出除去し，PTC-ペプチドをトリフルオロ酢酸で環化切断する．
生成遊離したATZ-アミノ酸を酢酸エチルで抽出しコンバージョンフラスコへ転送する．
残ったペプチドは反応を繰り返し，逐次新生するN末端アミノ酸をATZ誘導体とする．
ATZ-アミノ酸は溶媒を気化除去して２０％アセトニトリルに溶解し，同定用オンラインPTHアナライザーに注入する．原理的には無限のアミノ酸配列が決定できることになるが，実際には，各反応が完全でないこと，試薬中の不純物のため一部のN末端が閉鎖されること，抽出溶媒により試料ペプチドが流出するなどのため，PTH-アミノ酸の収量は徐々に減少する．第１サイクルで１００あったシグナルは９５％の反復収率の場合，４５サイクルで１０を割り，８サイクルで１となる．アミノ酸配列分析において同定不可能になるのは反復収率によるシグナルの減少だけでなくバックグラウンドシグナルの上昇（S/N比の低下）も大きく影響する．反応しなかった部分は次のサイクルに持ち越され，サイクルごとに累積する．また酸による非特異的な切断も起こり，それらがバックグラウンドシグナルを形成し，一般に高分子量のタンパク質ほど急激にバックグラウンドシグナルが上昇する．

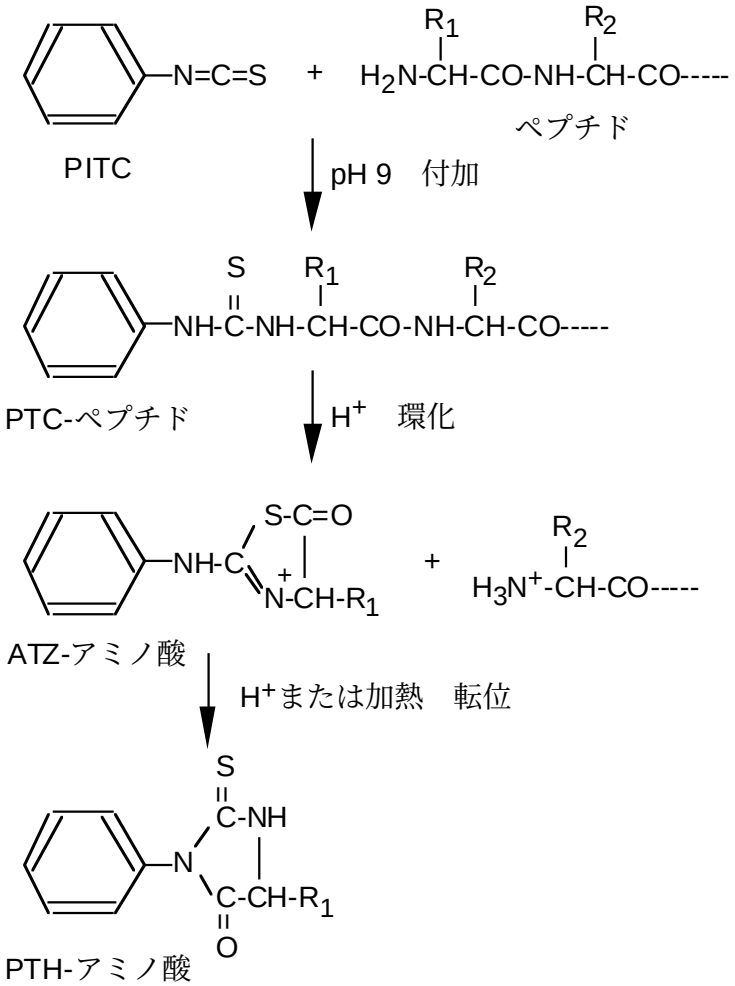


図　エドマン法の原理

2.2 方法

以下にABI 473A気相プロテインシーケンサーの取扱いを簡単に説明する.

（１）始動

① アルゴンガスのレギュレターを開き，ガスを装置に供給する（４．５kg/m).
② 機械の電源ON.
③ セルフテストを行う.

（２）試薬及び溶媒の供給

① 装置にセットされている試薬や溶媒の残量が少ないときには新たに追加する.

使用可能なサイクル数の目安

R1	R2	R3	R4	S2B	S4B
400	180	400	200	100	150

② アルゴンガスをボトルにpurgeする.

（３）PTH-アナラーザー（HPLC装置）のセットアップ

① Solvent A3, Solvent B2の残量確認.
② HPLCポンプのpurge.

（４）サンプル分析

PTHアナライザーによるPTHアミノ酸スタンダードの分離がきちんとなされているか確認したら，サンプル分析を開始する.

① サンプルの取り付け.
② リークテスト.
③ シーケンシングプログラムの作成（Model 610A）.
④ 分析開始.

サンプル解析に際し，サンプルload前及びload後に，スタンダードタンパク質（b-lactoglobulin, b-LG）を１０残基解析し，シーケンサーの分析状態（初期収率, 反復収率）を把握する.

（５）シーケンスデーター解析

Macによるデーター解析（Model 610A）.

① キャリブレーション
② アナライズ
③ コールシーケンス

（６）停止

① 試薬ボトルの取り外し
② ライン洗浄
③ ガスレギュレターを閉じる
④ 電源OFF

§３ 装置の仕様

（１）仕様

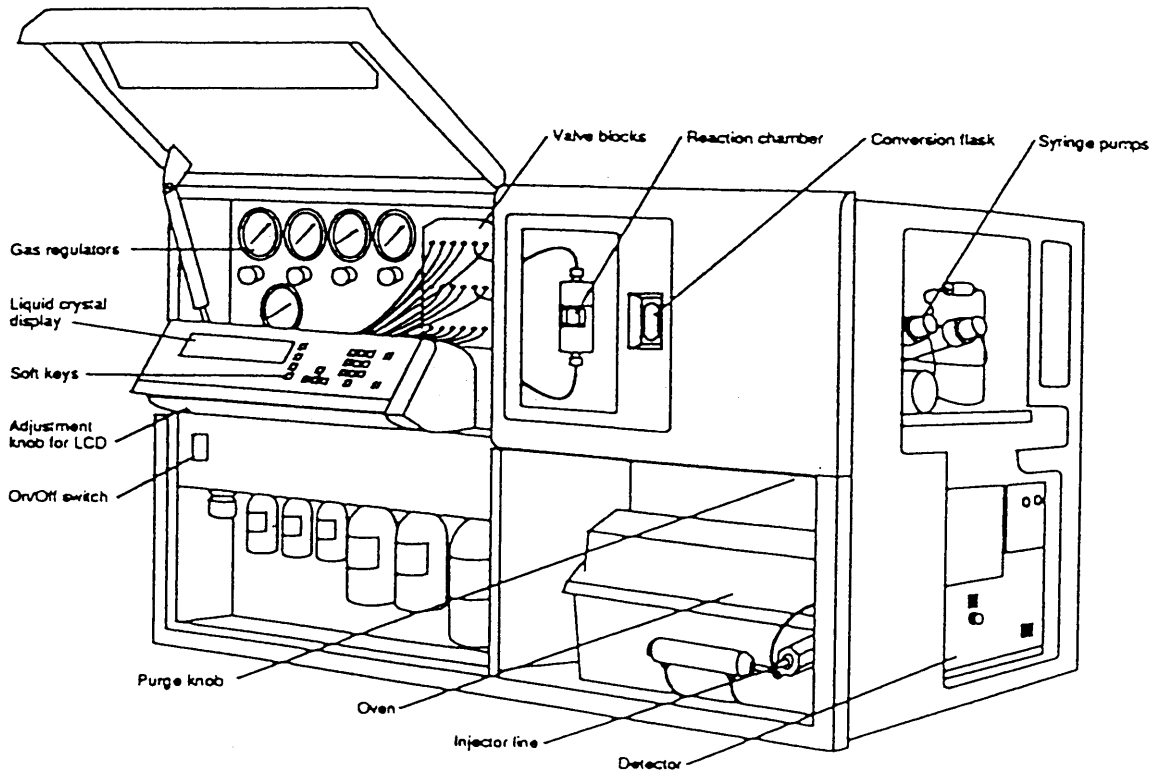
機種　　：パーキンエルマー　アプライドバイオシステムズ　473A
分析感度　：50～100 pmol

（２）付属設備

パソコン　：マッキントッシュ IICx
解析ソフト　：Model A610 ver 1.0.2

§４ 利用上の注意事項

① 使用に際しては，古石助手がお手伝いします.



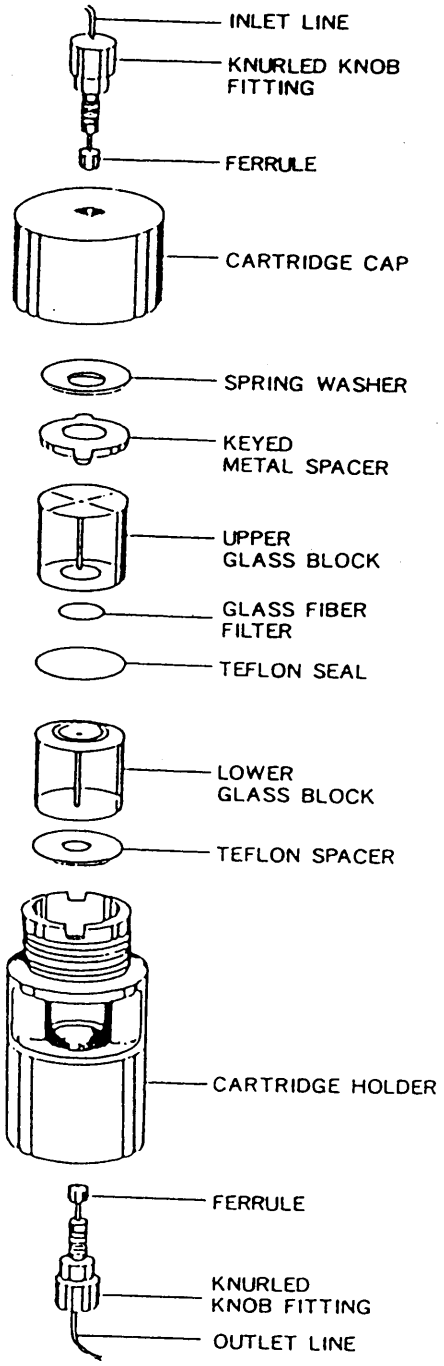
Bottle 1 X1 PTH-AA standard
Bottle 2 R3 TFA
Bottle 3 R4A 25% TFA
Bottle 4 R1 PITC
Bottle 5 R2 TMA
Bottle 6 S4B Acetonitrile
Bottle 7 S2 Ethyl acetate

Chemical to Load at Each Bottle Position

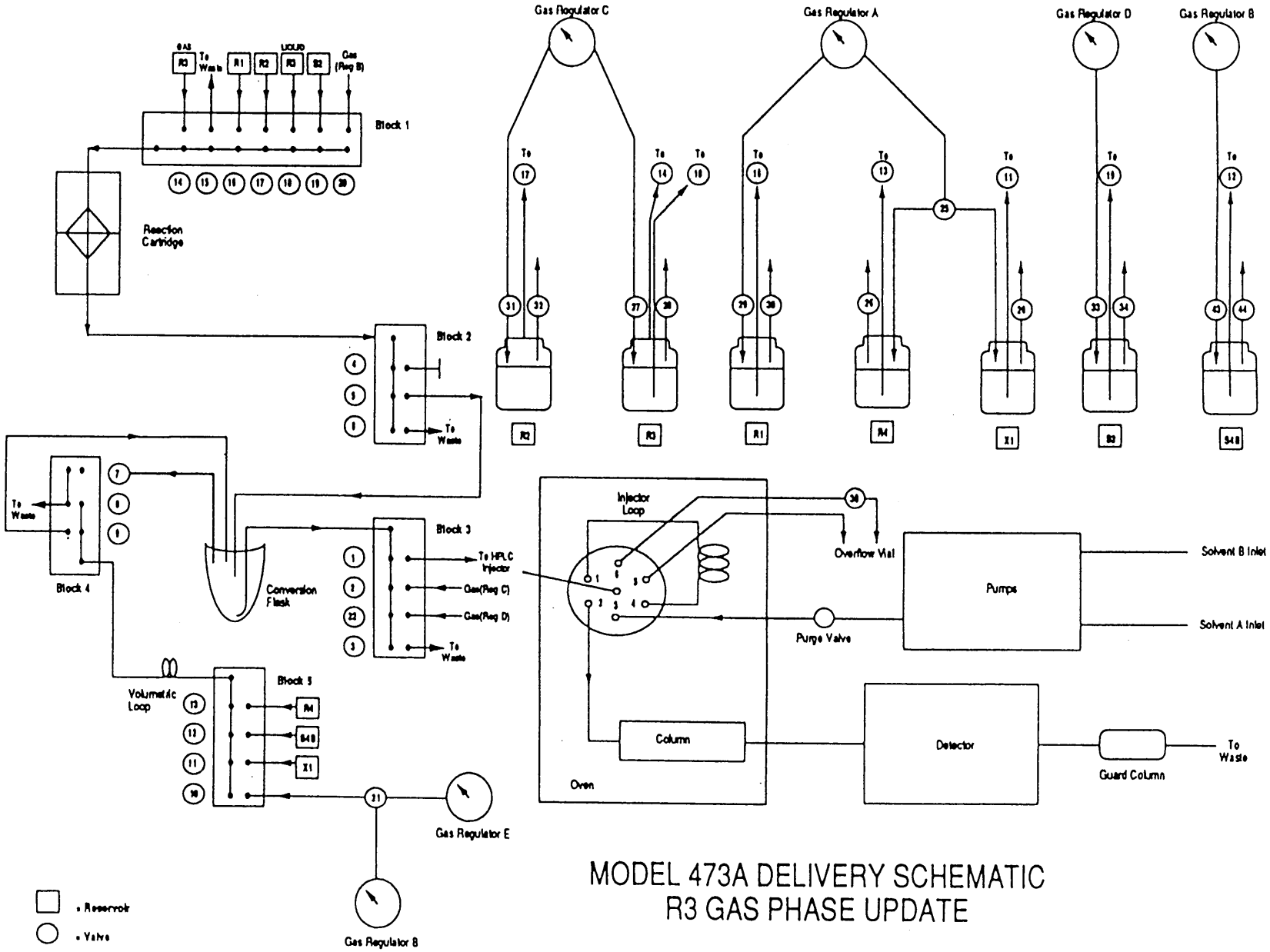
Sequencer Reagents and Solvents

Position	Name	Contents
4	R1	5% phenylisothiocyanate (PITC) in n-heptane
5	R2	12.5% trimethylamine (TMA) in water
2	R3	Trifluoroacetic acid (TFA), neat, with 0.002% dithiothreitol (DTT)
3	R4A	25% TFA in water, with 0.01% DTT
1	X1	PTH-standard in acetonitrile
6	S4B	20% acetonitrile in water
7	S2B	Ethyl acetate

VERSION 1.00A: 11/13/89



図－1. カートリッジ・アセンブリー



MODEL 473A DELIVERY SCHEMATIC
R3 GAS PHASE UPDATE

Table 3-1 Model 473A Functions

NO.	NAME	VALVES	DESCRIPTION
Reaction Cartridge Functions (Functions 1 through 18 are activated as reaction cartridge functions)			
1	PREP R1	6, 20, 29, 30	Pressurizes R1 bottle; purge lines
2	DELIV R1	6, 16, 29, 30	Delivers R1 to Rxn cartridge
3	LOAD R1	15, 16, 29, 30	Loads valve block with a measured amount of R1 for subsequent metered delivery
4	PREP R2	6, 20, 31, 32	Pressurizes R2 bottle; purge lines
5	DELIV R2	6, 17, 31	Delivers R2 to Rxn cartridge
6	LOAD R2	15, 17, 31, 32	Loads valve block with a measured amount of R2 for subsequent metered delivery
7	PREP R3	6, 20, 27, 28	Pressurizes R3 bottle; purge lines
8	DELIV R3	6, 18, 27	Delivers R3 to Rxn cartridge
9	LOAD R3	15, 18, 27, 28	Loads valve block with a measured amount of R3 for subsequent metered delivery
10	PREP S2	6, 20, 33, 34	Pressurizes S2 bottle; purge lines
11	DELIV S2	6, 19, 33, 34	Delivers S2 to Rxn cartridge
12	LOAD S2	15, 19, 33, 34	Loads valve block with a measured amount of S2 for subsequent metered delivery (wash)
13	PREP XFER	5, 7, 20, 33, 34	Gas through transfer lines
14	XFER S2	5, 7, 19, 33, 34	S2 to Rxn cartridge & flask
15	XFER GAS	5, 7, 20	Delivers gas through transfer line to flask
16	DELIV ATZ	4, 19, 33, 34	Used for manual collection of ATZ extract
17	DRY CART	6, 20	Gas through Rxn cartridge
18	BLK 1 FLSH	15, 20	Delivers gas to dry the fluid path in valve block 1
Reaction Cartridge and Conversion Flask Functions (Functions 21 through 49 can be activated as reaction cartridge or conversion flask functions)			
21	LOAD GRAD	----------	Loads gradient into pump memory
22	INIT GRAD	----------	Halts pump, fills syringes, equilibrates the system at gradient time zero conditions
23	START GRAD	----------	Starts gradient from time zero
24	STOP PUMP	----------	Stops the pump
25	HP INJECT	1, 9, 10, 21, 36, 38	Maintains high pressure loop loading conditions and moves the loop to inject position
26	HP INJ CLR	1, 9, 10, 21	Clears the line to the injector (independent of the inject position)
27	HP INJ LOAD	1, 9, 10, 21, 38	Fills under high pressure when the loop outlet is closed
28	XFER TO INJ	1, 9, 10	Delivers sample to injector
29	INJECT POS	36	Moves injector to "inject" position
30	LOAD POS	35	Moves injector to "load" position

Table 3-1 Model 473A Functions (continued)

NO.	NAME	VALVES	DESCRIPTION
Reaction Cartridge and Conversion Flask Functions (Functions 21 through 49 can be activated as reaction cartridge or conversion flask functions)			
31	OUTLET CLSD	38	Closes the overflow line from the loop
33	RXN HEATER		Set cartridge temperature °C
34	CNV HEATER		Set flask temperature °C
35	COLUMN HEATER		Set column temperature °C
37	+SENSITIVITY		Raises detector sensitivity setting
38	-SENSITIVITY		Lowers detector sensitivity setting
39	AUTO-ZERO		Absorbance set to zero
40	WAIT		Close valves and wait
41	EVENT 5 ON		Turns event 5 on
42	EVENT 5 OFF		Turns event 5 off
43	EVENT 6 ON		Turns event 6 on
44	EVENT 6 OFF		Turns event 6 off
45	RELAY 0		Changes relay 0 setting (toggles between on and off)
46	RELAY 1		Changes relay 1 setting (toggles between on and off)
48	CHANGE R	25,26,27,28,29,30,31,32	Vents reagent bottles
49	CHANGE S	33, 34, 43, 44	Vents solvent bottles
Conversion Flask Functions (Functions 51 through 66 are activated as conversion flask functions)			
51	PREP R4	2, 7, 9, 10, 25, 26	Pressurizes R4 bottle; purge lines
52	DELIV R4	2, 7, 9, 13, 25, 26	Delivers R4 to flask
53	LOAD R4	8, 13, 25, 26	Loads valve block with a measured amount of R4 for subsequent metered delivery
54	PREP X	2, 7, 25, 26	Pressurizes X1 bottle; purge lines
55	DELIV X	2, 7, 9, 11, 25, 26	Delivers X1 to flask
56	LOAD X	2, 7, 8, 11, 25, 26	Measures amount of X1
57	PREP S4	2, 7, 9, 10, 43, 44	Pressurizes S4 bottle; purge lines
58	DELIV S4	2, 7, 9, 12, 43, 44,	Delivers S4 to flask
59	LOAD S4	8, 12, 43, 44	Loads valve block with a measured amount of S4 for subsequent metered delivery
60	FLASK BUBL	2, 7	Bubbles gas through the pick-up tube into the transfer flask
61	DRY FLASK	2, 7, 9, 10	Flushes flask w/gas and vapors vent to waste
62	EMPTY	3, 9, 10	Empties flask contents
63	BLK 45 FLSH	8, 10	Delivers gas to dry valve block 3, the metering loop and valve block 4 (Activate this function before venting the flask.)
64	BLK 3 FLSH	2, 3	Clears the flow path in block 5 with gas
65	FLSK BBL HI	7, 22	Bubbles high pressure gas through the pick-up tube into the transfer flask
66	DRY FLSK HI	7, 9, 10, 22	Dries the contents of the flask with high pressure gas

超遠心分離機
（Beckman L7-65型）

薬学部　放射薬品学研究室　中山　仁；内線 4357
國安明彦；内線 4359

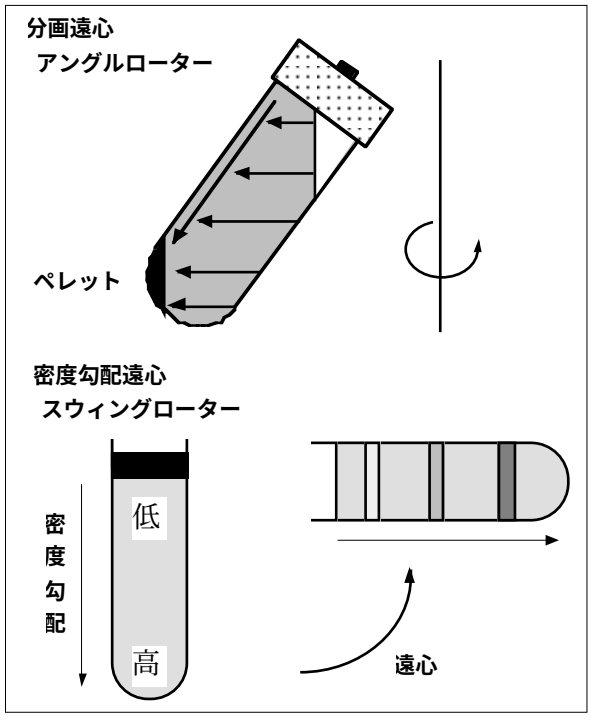
§１　はじめに

遠心分離機は、生体物質の分離・精製に日常的によく用いられる装置の一つである。試料溶液をローターに入れ、高速で回転させることにより遠心力場をつくり、試料中の粒子を密度で分離・分画する。一般に真空ポンプを備え、最大遠心加速度600,000 x g が得られるように設計されている装置を超遠心分離機と呼んでいる。

薬学部分析センターには、操作が簡単な基本モデルであるBeckman社 L7-65 型超遠心分離機と、使用頻度が高い Type 45Ti とType 70.1Ti の２種類のアングルローターおよびスウィングローター SW 28 を備えている。

§２　原理・理論

遠心法には大きく分けて分画遠心法と密度勾配遠心法がある。前者は試料溶液のみを遠心するもので、溶質粒子が溶媒より重いときはペレッティング、軽い場合はフローティングとなる。この方法は異なる粒子を一回の遠心で完全に分けることはできないが、簡便で頻繁に行われる。後者は、溶媒で密度勾配を作って対流を抑え、種々の粒子が密度に応じて各々のバンドを形成することによって分離する。この方法では前もって作製した密度勾配の上に試料溶液を重層して遠心する。溶質粒子が等密度の溶媒の場所に完全に移動するまで遠心を行い密度によって分離する方法と、平衡に達する以前に遠心を止める沈降速度の違いに基ずく分離方法がある。この他、塩化セシウム (CsCl) 密度勾配平衡遠心法がある。



ローターは、遠心方法や分離目的に応じて、最適のものを選択する。種類には遠心チューブを斜めに保持するアングルローター、重力と遠心力の合力が常に遠心チューブの長軸方向にかかるスウィングローターや遠心チューブの垂直方向に遠心するバーティカルローターがある。最近ではネオバーティカルと呼ばれ

るものも出てきた。分画遠心法では、通常、アングルローターを用いることが多い。密度勾配遠心には、主としてスウィングおよびバーティカルローターが用いられる。また、アングルローターも使用されることがある。

§３　ローターと遠心チューブについて

ａ）ローター

ローターとは遠心管を支えて回転する部分のことをいう。遠心機の非常に重要な部品であり、非常に高価。

１、ローターの種類

ロータ名	Max rpm	Max g	*K* 値	チューブ容量 x 数
Type 45Ti*	45,000	235,000	133	6 x 96.0 mL
Type 70.1Ti*	70,000***	450,000	36	12 x 13.5 mL
SW 28**	28,000	141,000	246	6 x 39.0 mL

*　Tiと末尾につくのはチタン製。

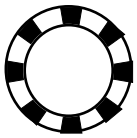
**　SW28は、本体がアルミニウム製、バケットがチタン製。

*** 本センターのＬ7-65 は、最大 65,000 rpm までしか回転できない。

２、取り扱い方

ローターは想像を絶する強い遠心力がかかるため、わずかな傷や腐食、ひずみ等が重大な事故を引き起こす危険性がある。したがって、慎重かつ丁寧に取り扱う。ローターは、腐食しにくいチタンでできているものが多い。しかし、ほとんどの生物試料中には塩が含まれているので、腐食しやすい環境にさらされている。使用後は水洗いし、ペーパータオルの上に逆さまにして、乾燥させる。また、遠心中の気密性を保つ上で、Oリングの状態に気をつける。Oリングが遠心途中で切れると、ローターのバランスが崩れ、大事故につながる恐れがある。

Beckman 製ローターには、右の図のようにローター下部に過速防止用のオーバースピードディスクが貼り着けてある。このディスクを傷つけないように、ローターは必ず柔らかい布などの上に置き、遠心シャフトに装着する時も注意する。



オーバースピードディスク

ｂ）遠心チューブ

１、遠心チューブは、本機の使用に際しては必ずBeckman 純正品を使用する。

２、いろいろな材質や形状のものがあるが、機械的強度、耐溶媒性、寿命、安全性等を考慮の上、次に挙げるチューブの使用を奨める。(日立製は使えない)

Type 45Ti	Polycarbonate Bottle Assembly (Cat. 355622)
Type 70.1 Ti	Polycarbonate Bottle Assembly (Cat. 355603)
SW 28	Polyallomer (Cat. 326823)、またはUltra Clear (Cat. 344058)

３、チューブは使用する前によく観察して、縦割れのヒビや変形等が生じたチューブは使わない。基本的に消耗品と考える。

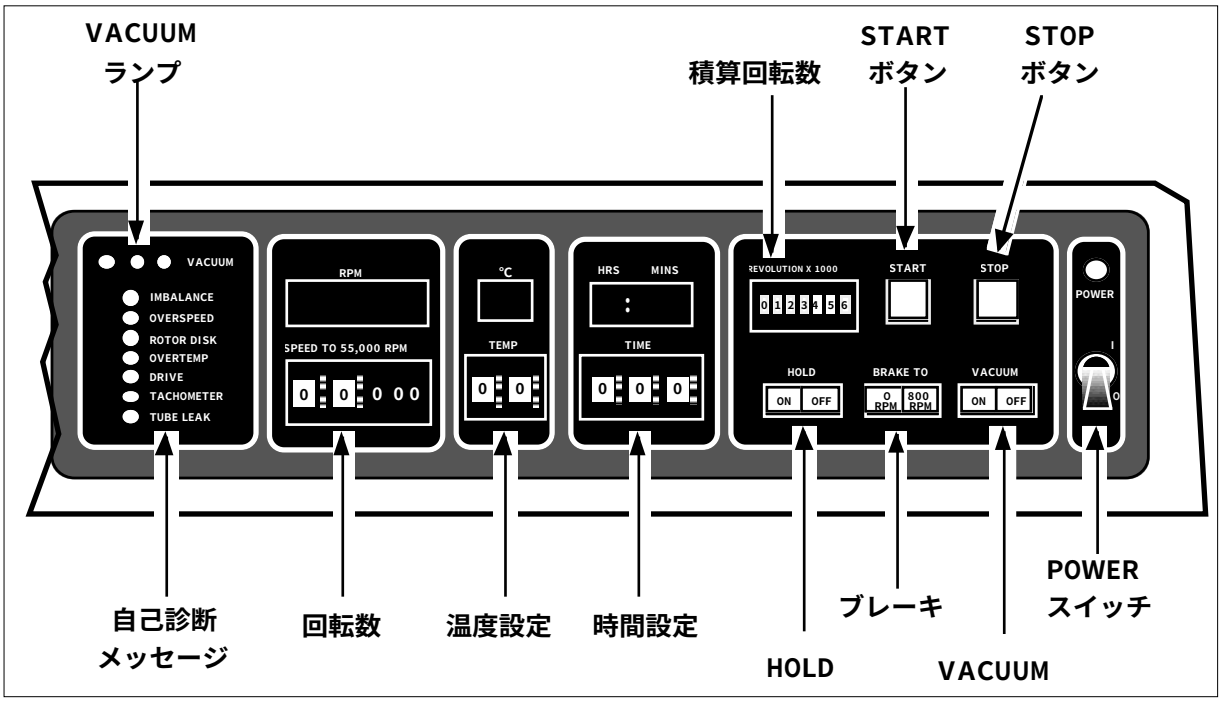
4、また、上記のチューブはアルカリ洗剤 (例えば Scat、アルカリExtran など) に弱いので、洗浄する際は必ず中性洗剤 (中性Extran など) を使用すること。

§４　遠心操作

ａ）使用する前に準備しておくこと

・ローターの予冷（予冷は低温室か冷蔵庫で行う。チャンバー内ではしない。）

・チャンバーの予冷（遠心開始20分前で十分）



ｂ）遠心操作

１、物理化学共同実験室の壁側にあるメインスイッチ (ボックスの中) および遠心機本体のPOWER スイッチをONにする。

２、運転条件を設定する。

1) 回転速度と温度をロータリーサムスイッチで設定する。

2) 運転時間をロータリーサムスイッチで設定する。

運転時間が10時間以上の場合はHOLDスイッチをONにする。

(HOLDモードの際にはゼロが表示される）

3)ブレーキスイッチによって停止時の減速率を選ぶ。

ON : (通常こちらを選ぶ）

800：800 rpmからゆっくりと減速する。（密度勾配遠心時）

３、試料を遠心チューブに注入し、天秤でバランスを合わせる（1 目盛り以内）。

1) 試料は、遠心チューブの半分以上（８割くらい）必ず入れること。

・試料液が少ないと遠心中にチューブが割れて、大事故につながる恐れがある。

・スウィングローターチューブ (Ultra Clear など) には、チューブ上端から５mm 位の高さまで試料を入れる。

2) バランスを合わせた後、キャップをしっかりと締める。

4、ローターに遠心チューブを装着する。

1) ローターをシャフトにつけたままでのチューブの取り付けは絶対しない。

2) 装着位置を間違えるとバランスが崩れるので確認する。

・アングルローター

・挿入後ローターの上ブタがローター本体にしっかりと密着していること、Oリングがよじれてはみ出たり、切れたりしていないか確認した後、ネジを手で回して締める。

・ネジは回らなくなるところまできっちり締めた後、ほんの少し戻す(時計で5分程度の角度)。

・スウィングローター

・バケットがローターのフックに確実に掛かっていること、所定の箇所に6本全て、取り付けられていることを確認する。

5、チャンバー・ドアを開けて、ローターを遠心機のドライブシャフトに装着する。

1) SW28 などローター下部にピンのあるものは、遠心機ドライブシャフトのピンの上に乗らないように、位置を確認してから装着する。

注）噛み合っていないまま運転を開始すると、ローターがはずれたり、回転開始時ローターがドライブシャフトピンの頭から落ち、その衝撃でどちらかが損傷してしまう可能性がある。

2) スウィングローターは、装着後バケットがはずれていないか必ず確認する。

6、チャンバー・ドアを閉め、VACUUMスイッチを ON にする。
(ONにしないと、STARTしない)

7、STARTボタンを押して遠心を開始する。（緑のランプが点滅）

8、途中で止める場合はSTOPボタンを押す。
TIMEモードでの遠心は、ディスプレイ上でゼロが表示されると自動的に終了。

１０、ローターが完全に停止したらVACUUMスイッチを OFF にしてチャンバー内の真空を解除し、チャンバー・ドアを開けて、ローターを取り出す。
（遠心と遠心の間では、チャンバー・ドアを閉めた状態にしておく）

c）使用後のメンテナンス

1、チャンバー内の汚れや水滴を柔らかい布やペーパータオル等でふき取る。

2、チャンバードアを閉め、本体POWER スイッチ及び壁側メインスイッチをOFFにする。

3、ローターのメンテナンス。

1) ローターは水道水で洗った後、脱イオン水ですすぎ、乾燥させる。

2) グリースをOリング (白いチューブ) とネジ部 (アルミネジ用) に塗布する。

d）トラブルシューティング

1）警告

IMBALANCE　：ロータのバランスが合っていない
OVERSPEED　：ロータの回転速度の超過
ROTOR DISK　：ロータ底面にあるオーバースピードディスクからの信号異常
OVERTEMP　：チャンバー内の温度が30℃を越えている
DRIVE　：駆動装置の加熱またはオイルポンプの故障
TACHOMETER　：回転速度計の信号異常
TUBE LEAK　：チューブからの試料漏れに起因するチャンバー内真空度の低下

2）運転中に停電した場合

万一、運転中に停電など理由で電源からの電力供給が中断した場合、ローターは慣性力によって回転を続ける。ローター回転中に電源が復帰すれば、遠心機は再び作動してローターは元の設定回転数に戻る。もし完全にローターが停止した場合は、電源復帰時にもう一度STARATボタンを押して、再び回転を開始させる。

§５　仕様（取り扱い説明書より抜粋）

回転速度

設定可能回転速度・1,000 - 65,000 rpm まで1,000 rpmステップ
回転数制御制度・・実際のローター回転数は設定回転数の20 rpm以内
回転数表示・・・・ディジタル読取装置が実際のローター回転数を100 rpm
ステップで表示

ロータ温度

設定可能温度・・・0から29℃まで1℃ステップ
通常動作範囲・・・2℃から周囲温度（室温）まで
温度制御制度・・・平衡後の実際のロータ温度は設定温度の±2℃
温度表示・・・・・ディジタル読取り装置が実際のロータ温度を表示

運転時間

設定可能時間・・・9時59分まで設定可能。それ以上はHOLDモード
時間表示・・・・・時間設定のよる運転中はディジタル読取装置が残り運転時間を表示するHOLDモードによる運転ではゼロが表示される
加速・・・・・・・・運転開始後、0 から300 rpmまでは自動低加速し、その後、設定回転数まで最大加速する
減速・・・・・・・・２種類の減速率を選択できる。ローターが完全に停止するまでブレーキが作動する完全制御方式と、800 rpm からはブレーキが解除される部分制御方式がある

§６　利用上の注意

１）予約カレンダーに前もって記入する。（氏名、研究室、ローター、時間帯）

２）使用に際しては、ローターと遠心機のそれぞれのログブックに必ず記入すること。日付、使用前積算回転数、使用後積算回転数、使用積算数 (使用後から使用前から引いた実質回転数)、サンプル名、使用者名 (教室名）

§７　応用例（K値を利用した分離時間の求め方）

溶液中に分散している粒子をチューブのトップ (R min) からボトム (R max) まで沈降させる沈降時間ｔ (hr) は、K値を利用するとSvedberg unit (*S*) から直接推定できる。

$$K = \frac{\ln (R_{max} / R_{min})}{\omega^2} \times \frac{10^{-13}}{3600} = \frac{2.53 \times 10^5 \times \ln (R_{max} / R_{min})}{(rpm / 1000)^2} \quad \cdots\cdots (1)$$

つまり、K値とは1*S* の粒子をR minからR maxまで沈降される時間のことである。

K値、*S* 値と沈降時間ｔは、次のような式に当てはめられる。

$$t = \frac{K}{S} \quad \cdots\cdots (2)$$

例えば、Type 70.1 Ti ローターで40,000 rpm、30分で沈降する粒子をType 45Ti ローターを用いて沈降させたいとする。36,000 rpmで遠心する場合、沈降に要する時間は、以下のようにして求めることができる。

まず、(1) 式にType 70.1Ti のR max、R min と回転数を代入し、K値を求めた後、(2) 式により目的の粒子の*S* 値を求める。

$$K = \frac{2.53 \times 10^5 \times \ln (82.0 / 40.5)}{(40{,}000 / 1000)^2} = 111.5$$

$$S = \frac{111.5}{0.5} = 223$$

Type 45Ti ローター 36,000 rpmで遠心する時のK値を、(1) 式によって求めると

$$K = \frac{2.53 \times 10^5 \times \ln (103.8 / 35.9)}{(38{,}000 / 1000)^2} = 186.0$$

求めたK値と粒子の沈降係数*S* を(2) 式に代入し、沈降に要する時間 t を算出できる。

$$t = \frac{186.0}{223} = 0.834 \text{ (hr)} = 50 \text{ (min)}$$

元素分析装置
（ヤナコ　MT-3/MT-5）

機器分析センター　白木邦子；内線 4829

§１　はじめに

有機化合物，天然物などの同定および化学構造の推定や確認を行う場合，物質を構成している元素の組成を正確に定量することが重要である．元素分析装置（CHNコーダー）は有機化合物の主構成元素であるC, H, Nを完全燃焼分解し，H_2O, CO_2, N_2に変換，これらの各成分を測定し，試料の構成元素C, H, N量を測定する装置である．

§２　原理

装置は試料を燃焼，分解する燃焼部，燃焼により生成したH_2O, CO_2, N_2を採取する定量ポンプ部および検出部から構成されている．

＜燃焼部＞

秤量された試料はあらかじめヘリウムと酸素の混合ガス雰囲気にさらされた燃焼管に挿入し，燃焼させる．燃焼管には酸化銅，サルフィックスが充填されており，燃焼ガスはここで完全に酸化され還元管に送られる．還元管には銀粒，還元銅が充填され，燃焼ガス中の窒素酸化物を窒素に還元し，さらに過剰の酸素を除去する．また，試料中のハロゲン，イオウはサルフィックス，銀粒で除去する．燃焼ガスはこのようにしてH_2O, CO_2, N_2となりヘリウムと共に定量ポンプに全量採取される．

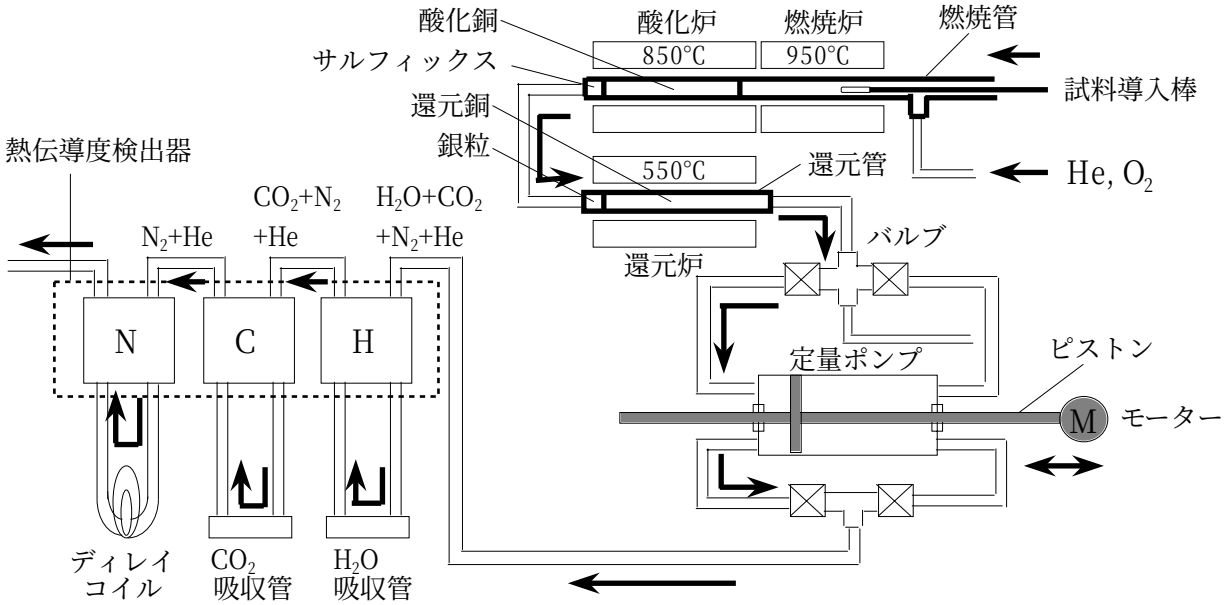


図１　元素分析装置の原理

＜定量ポンプ部＞

定量ポンプは150 ml の容量をもち，試料が燃焼管に導入される時点ではすでにピストンが左から右へ作動し，吸引を開始する．定量ポンプに燃焼ガスを全量採取すればバルブを閉じ密閉状態になる．この状態で定量ポンプ内の燃焼ガスの均一混合を計り，又同時にポンプ内温度に順応させる．次にピストンは一定速度で燃焼時と逆に作動し，ポンプ内の燃焼ガスを検出器に送る．

＜検出部＞

検出器は熱伝導度検出器を使用し，３対が直列につながっている．それぞれの対の試料側と参照側は H_2O 吸収管，CO_2 吸収管およびディレイコイルが接続され，第１対目が水素（H_2O），第２対目が炭素（CO_2），第３対目が窒素（N_2）測定用となっている．ディレイコイルは，ポンプとほぼ同容積（150 ml）で，あらかじめヘリウムガスでみたされており，測定時このヘリウムが検出器（N）の参照側に流れる．したがって，検出器（H）では H_2O 吸収管により除去された H_2O 濃度分が，検出器（C）では CO_2 吸収管により除去された CO_2 濃度分が，検出器（N）では N_2 濃度分がそれぞれH，C，N 濃度に対応した信号として得られる．これら３つの信号はプログラマにより順次計測され，H，C，N の順にプリントアウトされる．

＜計算＞

試料の H，C，N の含有率を求めるには，あらかじめ標準試料の測定を行い，H，C，N の理論量を各成分の補正シグナルで割った検出感度を算出しておかなければならない．各成分の計算式を（１），（２），（３）に示す．

$$H(\%) = Q_H \times F_H \times \frac{P}{760} \times \frac{100}{W} \qquad Q_H = X_H \times S_H \qquad (1)$$

$$C(\%) = Q_C \times F_C \times \frac{P}{760} \times \frac{100}{W} \qquad Q_C = X_C \times S_C \qquad (2)$$

$$N(\%) = Q_N \times F_N \times \frac{P}{760} \times \frac{100}{W} \qquad Q_N = X_N \times S_N \qquad (3)$$

W	：	試料の秤取量（μg）
P	：	測定時の気圧（mmHg）
S_H, S_C, S_N	：	標準試料における各成分の検出感度（μg/count）
X_H, X_C, X_N	：	各成分の測定シグナル（count）

ここで F_H, F_C, F_N はそれぞれ H，C，N の補正係数である．定量ポンプより H_2O, CO_2，N_2，He の混合気体が送り込まれることにより，H_2O, CO_2，の検出器セルでは，目的成分以外の成分が同時に通過し，N_2 検出器セルでは，それまでに吸収管で除去された成分によって各検出器の感度に誤差を生じているため補正係数 F_H, F_C, F_N が必要となる．

§３　測定方法

＜操作手順＞

装置を作動する前に以下のことを確認する．

・制御部前面パネル AUTO / MANUAL スイッチがすべて AUTO の位置であること．
・プリンター記録紙，インクリボンが入っていること．
・吸収剤，還元銅が劣化していないこと．
・ヘリウム，酸素ボンベの元栓が開いていて，ゲージの２次圧が 2〜2.5 kg/cm^{2}に調整してあること．

① 主電源スイッチを POWER の位置までゆっくり回し，ディスプレイ表示確認後 ON の位置まで回す．

② ヘリウム流量計でヘリウムが 180〜200 ml/min 流れていることを確認する．

③ [OPERAT] を押す．〔M1-1〕表示後　YES　を押し，[ENTER] を押す．
システムメッセージが ＊WAITING＊ に変化する．

〔M1-1〕＄　OPERATION　START　YES　OR　NO　?　＿

④ 分析プログラムが自動的に動き出せば（オペレーション START 約３０分後）
酸素流量計で15〜20 ml/min 流れていることを確認する．アラームが鳴り，
＊ANALYSIS OK＊ を表示するまで待つ．

⑤ 検出感度算出用標準試料および未知試料の分析をする．
試料は超微量天秤で適当量正確に白金ボートに秤量する．
試料の出し入れは，システムメッセージまたはアラームに従って付属の導入棒で行う．（特に白金ボート，試料導入棒の汚れに注意する．）

⑥ 分析が終了すれば，[OPERAT] を押す．〔M1-2〕表示後 [YES] を押し，[ENTER] を押す．システムメッセージが ＊RESTING＊ に変化する．

〔M1-2〕＄　OPERATION　STOP　YES　OR　NO　?　＿

⑦ 装置は自動的にあらかじめ設定した停止状態で停止する．
（OF の温度が300 ℃以上あるときは，主電源を切らない．）

§４　仕様

■ 機種	ヤナコ CHN コーダー MT-3，MT-5
■ 測定元素	炭素・水素・窒素
■ 測定精度	絶対誤差　±0.3 % 以内
■ 試料量	2〜3 mg
■ 分析能力	4〜8 回 / 時
■ キャリアーガス	ヘリウム　150〜200 ml / min
■ 助燃ガス	高純度酸素　8〜30 ml / min
■ 燃焼方式	ヘリウム，酸素混合方式

■ 温度設定範囲　　燃焼炉　100～1200 ℃（950 ℃）
（標準設定温度）　　酸化炉　100～1200 ℃（850 ℃）
還元炉　100～999 ℃（550 ℃）
■ 熱伝導度検出器　　60Ω 4素子タングステンフィラメント
■ 吸収剤　　H_2O：アンヒドロン（無水過塩素酸マグネシウム）
CO_2：ソーダアスベスト

§５　利用上の注意

・測定はオペレーターが行います.
・測定依頼書には含有元素名，予想%，融点などできるだけ詳細に記入して下さい.（試料の秤量や取り扱いの参考になります．）
・無機金属を含んでいる試料については必ず明記して下さい．これらは燃焼管を破損する恐れがありますので別の日に測定を行います．したがって日数がかかり，また，測定値に誤差が生じる場合もありますのでご了承下さい.
・試料はできるだけ純度の高いもので，よく乾燥したものをサンプル管に入れて出して下さい．（試料には目的物以外の不純物，ろ紙片，ほこりなどが含まれないよう再結晶，蒸留などの方法で精製して下さい．）
・液体試料はなるべくアンプル管に入れて下さい.
・試料量は２ mg 程度必要です．１ mg でも測定可能ですが，誤差が大きくなる恐れがあります.
・容器には試料名，申込者名を記入したラベルを貼付して下さい.
・試料が有機物であるかどうかをスパーテル上で焼くなどして確認して下さい．その際，灰分の有無も確認して下さい.
・試料は乾燥の目的のためにも，不均一性を避けるためにもできるだけ微粉末にしてから乾燥して下さい.
・F を含む試料は装置の故障を招くので受け付けられません.

§６　応用例

CHNコーダーは通常，有機微量元素分析に使用されていますが，その応用として次のような分野でも利用されています.

・品質管理分析
・石油，石炭，コークスなどの燃料分析
・土壌，ヘドロの分析
・水中の浮遊物質および底質の分析
・大気汚染などの公害測定
・無機物の分析
・無機物中の結晶水，付着水の分析
・試料分解温度別による炭，水，窒素分析

粉末X線回折装置
(Rigaku RINT 2500 HF)

薬学部　製剤学研究室　平山文俊；内線 4161

§１　はじめに

固体物質の多くは結晶である。結晶にＸ線を照射すると、原子面からのＸ線の回折とそれに伴う干渉現象が観察される。これは、結晶中の原子、分子あるいはイオンが規則正しい３次元の周期構造を有しているため、原子間距離と同程度の波長のX線に対して回折格子として働くことに起因する。したがって、結晶にＸ線を照射して得られる回折Ｘ線は物質の内部構造に関する情報を含んでおり、それらを解析することにより結晶の内部構造を知ることができる。適当な大きさの単結晶が得られる場合は、単結晶Ｘ線解析により、結晶中の分子配列や分子構造を決定することができる。一方、粉末Ｘ線回折法は微細結晶あるいはその集合体である多結晶体などの内部構造に関する重要な情報を与える。たとえば、Ｘ線回折図は物質に固有なパターンを与えるため、物質の同定や結晶多形の確認などに利用される。さらに、回折図を解析することにより結晶性の程度（結晶化度）、粒子径、粒子分布などを推定することができる。

§２　原理

面間隔 d をもった格子面に θ の角度でＸ線（波長 λ）が入射し反射する場合（図１）、格子面の第一層で反射したＸ線と第２層で反射したＸ線間には $2d\sin\theta$ の分だけ行路差が生じ、この行路差が波長の整数倍（nλ）に等しい時、反射Ｘ線は互いに干渉して強度が強くなる。すなわち、$2d\sin\theta = n\lambda$ で表される Braggの条件式が成立するとき回折が起こる。ここで、n=1 の場合を１次反射、n=2 の場合は２次反射とよび、格子面のミラー指数 hklが既知の場合は（hkl）面からの反射とよぶ。粉末状の結晶は無数の結晶粒子からなるため、あらゆる方向に結晶が分布している。それら個々の粒子が Bragg の条件を満たす場合、回折Ｘ線は入射Ｘ線に対して円錐の母線に沿って進む。したがって、回折Ｘ線を平板フイルムで受けると、異なる面指数に対する回折線は Debye-Scherrer 環とよばれる同心円状のいくつかの円を与える（図２A）。一方、図２Ｂに示すように、試料を中心とした円周に沿って計数管を回転させると、回折Ｘ線強度が計数管の角度 2θ の

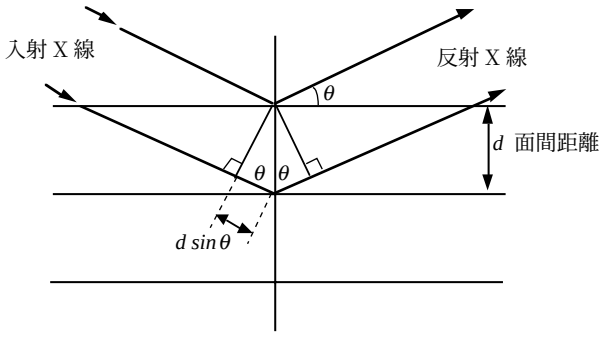


図１．ブラッグの反射条件

関数として記録される。粉末X線回折図は横軸に回折角（2θ）、縦軸に回折X線強度をプロットした図であり、格子面間隔 d は2θ 値から Bragg 式を用いて求めることができる。

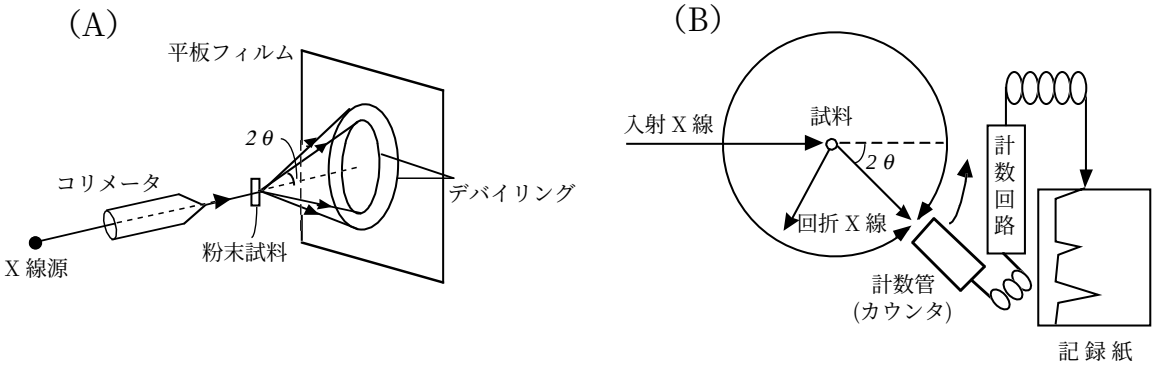


図２．ディフラクトメータの基本原理

§３　方法

1. 前準備
   - エアコンの温度を 25℃，冷却水の温度を 20℃ に設定
   - 冷却水循環装置の水位減ランプの消灯を確認
   - X-ray diffactometer 裏側のターゲットランプ (TEM, LW, HP, FLOW) の点灯を確認
   - IG (イオンゲージ) が 200 mV 以下であることを確認

     注）測定室内の除湿器の電源は常に電源 ON
2. X線発生手順
   - モニター，プリンター，ゴニオコントローラー (right，left) 電源 ON
   - CPU 電源 ON
   - ログイン画面の表示後 SEIKO D-scan 電源 ON
   - SEIKO D-scan の赤ランプの消灯を確認 (最上の緑ランプのみ点灯)
   - Login の後に rint (半角) を入力後リターンキー
   - Password はリターンキーのみ入力
   - 「RINT2500 XG モニター」内の XG 操作のダイアログをクリック
   - Power ON のアイコンをクリック (X 線本体電源 ON)
   - Ready のアイコンが緑になるのを確認
   - X-ray 発生のアイコンをクリックし，X 線の発生を確認 (本体上の赤ランプ点灯)
3. 測定処理
   - サンプルホルダーにサンプル面が手前になるように測定試料をセット
   - メインメニュー内の「右測定」を選択後，標準測定モードに入る
   - サンプル名，コメント，ファイル名等を入力
   - 測定パラメーターを入力
   - 上記パラメーターを確認後，測定のダイアログをクリック
   - 「コントローラーがリセットされました」のメッセージを確認 (初回のみ)
   - 確認のダイアログをクリック

・再度，測定のダイアログをクリックし，測定を開始する

（繰り返し測定の場合）

・先の測定が終了後，本体表示プレート右の黄色のボタンを押し，点滅確認後，サンプルを交換し，再び測定する．

注）できるだけ X 線をつけたり，消したりしないようにする

4. データー出力

・メインメニューの「ファイル管理」内の「ピークサーチ」を選択

・目的のデータを選択すると画面に測定結果が表示される

・ピークサーチなどの処理を適時行う

・ファイルのプルダウンメニュー中の印刷を選択

・ファイルのプルダウンメニュー中の終了を選択し，「ファイル管理」画面に戻る

（複数のデータを同時に書かせたい場合）

・「ファイル管理」内の多重ピークを選択

・書かせたいデータを複数選択し，実行のダイアログをクリック

・ピーク間隔や並べる順などを設定し，印刷

5. ファイル変換とバックアップ

・バイナリー-アスキーを選択

・希望のデータを選択後，ファイル内のプルダウンメニュー中のバックアップを選択

・「ディスケットを挿入してください．」というメッセージを確認

・フロッピーディスク (IBM DOS フォーマット; 720 k or 1.44 M) を挿入

・ファイル名を記入し，確認のダイアログをクリック

6. 測定終了操作

・「 RINT 2500 XG 操作」画面を表示

・管電圧を 20 kV，管電流を 10 mA に設定

・X 線発生のアイコンをクリックし，X 線 OFF

・X 線 OFF を確認

・Power ON をクリックし，Ready および Power ON の消灯を確認

・メインメニューファイル下のプルダウンメニューで終了を選択

・ログイン画面が表示され，Login の後に shutdown (半角) と入力後リターンキー

・画面左端に「Halted you may now cycle power」の表示を確認

・CPUの電源 OFF

・モニター，プリンター，ゴニオコントローラーおよび Seiko D-scan の電源 OFF

・冷却水を 25℃ に設定し，エアコン OFF

§ 4　仕様

機種：リガクRINT 2500 HF

Ｘ線発生装置：回転対陰極形（最大出力：18 kW、ターゲット：Cu）

付属装置：試料中低温装置（-100～300 ℃）、小角散乱測定装置

コンピュータ部：HP Apollo 9000 ワークステイション
応用ソフト：結晶化度、粒径、結晶系、長周期、格子定数、動径分布

§５　利用上の注意

単結晶X線解析装置と同じ利用規則に従って使用すること。試料量は 100～200 mg 程度が望ましい (サンプルの形状により多少異なる)。試料がホルダー内にこぼれた場合は適当な溶媒で浸したキムワイプ等で拭き取ること。

§６　応用例

スルホニル尿素系経口糖尿病治療薬トルブタミドは消化管液に対する溶解性が低く、結晶多形により溶解性が変化する薬物であるため、その錠剤は第 13 改正日本薬局方の一般試験法における溶出試験の適用対象となっている。トルブタミドを溶融ー冷却するとガラス体が得られる。このガラス体の示差走査熱量測定（DSC）を行うと20 ℃, 105 ℃, 127 ℃ に吸熱ピーク、70 ℃ に発熱ピークを与え、加熱により多形転移することがわかる。そこで、温度可変粉末X線回折装置を用いて様々な温度における回折パターンを測定した結果を図３に示す。0 ℃ から 90 ℃ に加熱すると $2\theta = 19.6^{o}$ のピークが増大する。さらに温度を上げると 19.6^{o} のピークは減少し、それに伴い新しいピークが出現する。90 ℃ の回折パターンはトルブタミドの結晶多形 Form C、120 ℃ のパターンは安定形 Form A のパターンに相当する。これらの回折データに基づいて DSC ピークを解析すると、20 ℃ のピークはガラス転移、70 ℃ のピークはガラス体から Form C への結晶化、105 ℃ のピークは Form C から Form A へ転移、127 ℃ のピークは Form A の融解に基づく熱変化に帰属される。このように、粉末X線回折装置と温度可変装置を併用することにより、固形医薬品の多形転移機構を解明できる。

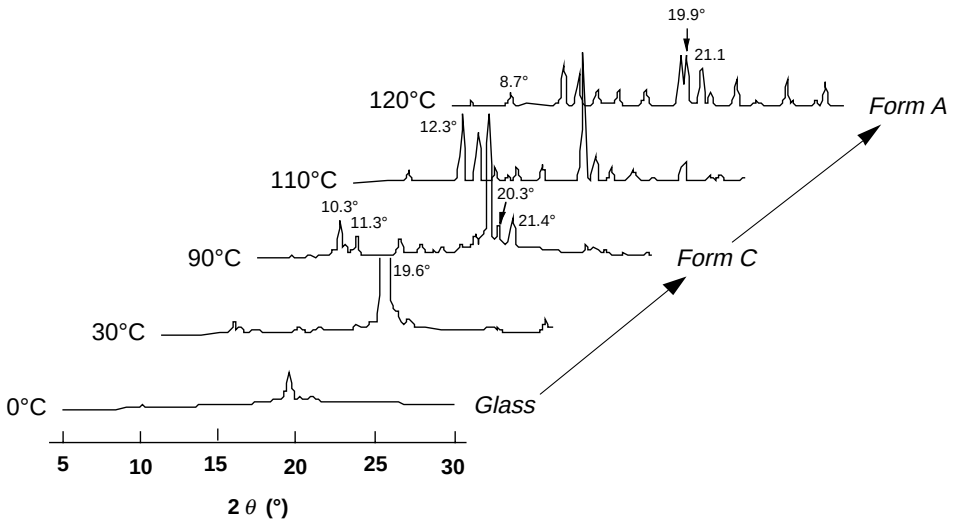


図３．トルブタミドの昇温過程における粉末 X 線回折図

単結晶Ｘ線解析装置
（Rigaku AFC-6・Rigaku RASA-7R）

薬学部　薬品製造工学研究室　衞藤　仁；内線 4579
薬学部　薬品物理化学研究室　後藤正文；内線 4310

§１　はじめに

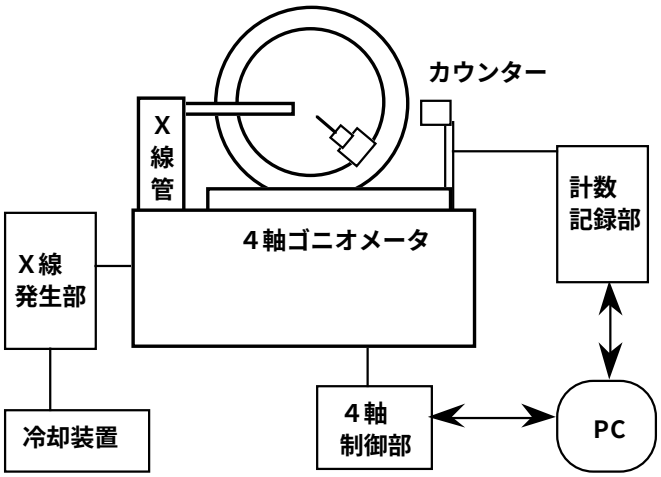
薬学・化学領域において、合成反応、天然物あるいは生体などから得られた物質の立体構造を知ることは、分子の機能性や反応性等を考える上で非常に重要なことである。

単結晶Ｘ線解析は、物質を構成する原子に含まれる電子とＸ線の相互作用によって生じる回折現象を利用して、結晶の原子配列を決定する。本法はスペクトルの特徴を解析して構造を決定する分光学的手法とは異なり、分子の三次元構造を直接目で確認出来る点で優れた手段と言える。単分子の立体構造や結晶中の分子配列に関する情報の量と信頼性は中性子解析につぎ高いものがある。

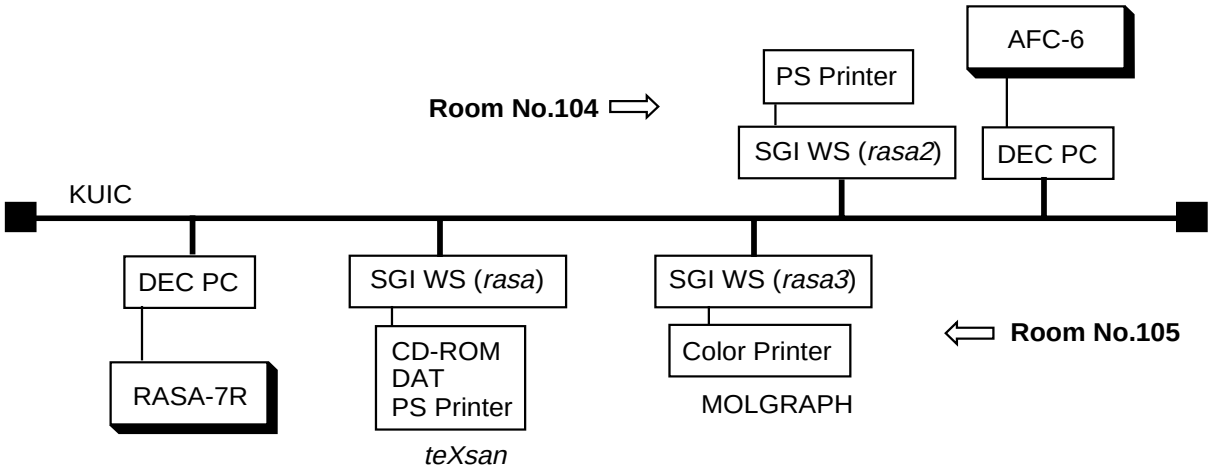
現在では、計算機能力の向上と解析プログラムの充実および Karle、Hauptmann らの直接法と呼ばれる解析手法の確立によって、構造決定に要する労力は著しく軽減され，低分子であれば数時間のうちに結果が得られ、有機化学者が自らの手でルーチン的に解析が行えるまでになっている。しかし、現実には解析がスムーズに進まない事も多く、さらに原子数が 100 をこえる分子では直接法が適用できないなど問題解決には結晶学の基本的な知識が必須である。

本手引き書は、熊本大学機器分析センター 104、105 号室に設置されている 4 軸回折計 (Rigaku AFC-6、Rigaku RASA-7R) および、その制御・解析系コンピュータ (DEC PC、SGI Indigo) の利用法について述べてある。これらの装置の配置および接続を下図に示す。

＜４軸回折装置＞



＜接続図＞



構造解析ソフトである *teXsan* は、*rasa* という名称の SGI Indigo に、分子表示システム (Daikin MOLGRAPH) は *rasa3* という名称の SGI Indigo2 にそれぞれインストールされている。各マシンはネットワークに接続されており *teXsan* はどのワークステーションからも、リモートログインすることによって利用できる (ただし、MOLGRAPH は *rasa3* でのみ利用可能)。

§２　仕様

Rigaku RASA-7R の仕様および周辺設備を以下に示す。

１．回転対陰極型Ｘ線発生装置

最大定格出力	：18 kW	
X線管電圧・電流可変範囲	：管電圧　20 kV ～ 60 kV (1 kV step)	
	：管電流　10 mA ～ 300 mA (1 mA step)	
ターゲット	：Mo	

２．循環式送水装置

温度制御範囲	：15℃ ～ 25℃	

３．コンピュータシステム

制御・データ測定部	：DEC PC	Rigaku AFC Control Softweare (CTR)
構造解析システム	：SGI Indigo	*teXsan*
分子計算支援システム	：SGI Indigo2	Daikin MOL-MOLIS/MOL-CRYS

§３　測定方法

１．試料結晶の用意

測定を行う結晶およびゴニオメータヘッドは、測定者が用意すること。結晶の大きさは、標準として、0.2 x 0.2 x 0.2 mm 程度の球形が最善だが、立方体に近いものなら充分である (ただし、極端な板状晶、針状晶は不適当) 。測定室に備えられている実体顕微鏡で寸法を測定し、最大長が 0.6 mm を越えないこと。かつ単結晶であることを偏光板を回転させ確かめる (結晶面が良く成長しており、結晶を回転させ結晶全体の消光の位置が一致していれば OK) 。

整形　　：切断は両刃の剃刀を使用し、実体顕微鏡下で行う。Bond 法は劈開のない比較的かたい結晶に有効。エッチングは比較的溶けにくい溶媒、または飽和溶液、再結晶溶媒を用いて行うとよい。

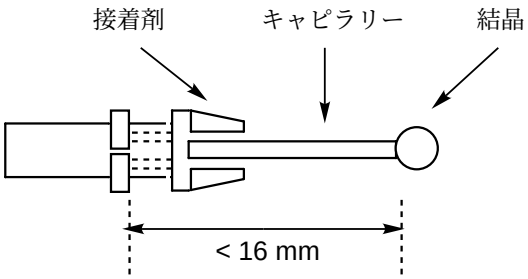
結晶の洗浄：再結晶溶媒で洗浄することが好ましい。結晶の割れ目の存在がわかる。

２．結晶のマウント

室温において安定な結晶の場合、ガラスキャピラリー上に接着する。

キャピラリーをバーナーで穏やかに熱し、針状としさらにもう１段ひいて測定する結晶より小さな断面積になるよう (半分位が良い) にし、切り口がキャピラリーに垂直になるように新しい剃刀の刃で切断する。これをマウントするピンに、先端の長さがピンの鍔の下部から 14±2 mm になるよう差し込み接着材または鑞で固定する。

室内に露出すると潮解、崩壊する結晶の場合はガラスキャピラリー内に固定する。

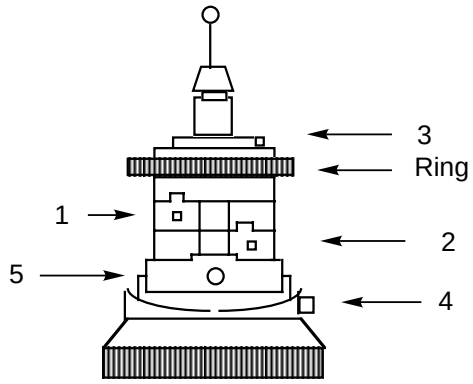


結晶をスライドガラスの端におき、接着剤で接着する。接着剤としてはエポキシ系接着剤 (２液混合系) がもっとも良い。他にアロンアルファなど。結晶に化学的、物理的変化を与えないものであること。

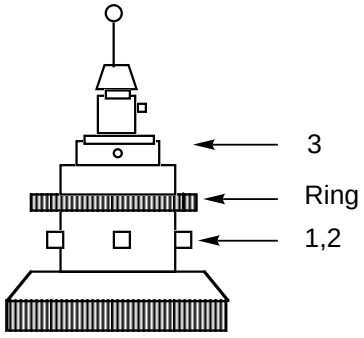
３．ゴニオメータヘッドへの取付け

ネジ１と２　：水平方向の移動　　ネジ４と５　：円弧方向の移動

ネジ３　　：垂直方向のロック　　リング　　：回転によって垂直方向移動



ユーセントリック型



XYZ 型

ラジオペンチ等で結晶をつけたピンをはさみ、ゴニオメータヘッドに差し込み、ネジによって固定する。

４．反射強度の測定

i) 冷却水温およびイオンゲージ圧の確認

冷却水温が 20℃であることを確認する。25℃位まで上がっていたら担当者に連絡する。Ｘ線発生装置の前面のパネルで IG にカーソルを移動し ENTER を押すとイオンゲージの出力が表示されるのでノートに記録。POWER ON スイッチを押す。

ii) ゴニオメータ制御用コンピュータの起動

ａ．コンピュータ (DOS/V) 本体 、ついでプリンタの電源をいれる。

ｂ．プロンプト C:X> が現れたら、データ測定を行うディレクトリ (例：CYTIDINE)を作成。

C:X> MD CYTIDINE CR　　(CR はリターンキーを示す)

次にディレクトリ CYTIDINE へ移動する。

C:X> CD CYTIDINE CR

ｃ．測定に必要なマスターファイル (AFC7R.XTL) を作成したディレクトリにコピーする。

C:X\CD CYTIDINE> GETMAS CR

ｄ．測定系コントロール画面に移る。

C:X\CYTIDINE> CTR CR

これで、ゴニオメータがコンピュータによって制御される状態となる。

iii) 結晶のセンタリング

ａ．結晶を付けたゴニオメーターヘッドを装置に装着し、台座のネジを回し固定。

ｂ．結晶を見やすい位置へゴニオメータを移動。

C:X\CYTITINE> OMEGA45 CR

ｃ．望遠鏡下で、視野の中央の十字線に結晶が位置するようにゴニオメータヘッドを調節。

ア）φ軸とゴニオメータヘッドの上下固定ネジをゆるめ、高さの調節を行う。ゴニオメータヘッドは自由にφ軸の回りで回転するので、ゴニオメータヘッドのネジ１と２を回転させ、φ軸を回転しても結晶の中心点が望遠鏡視野の十字線上にとどまるよう調節する 。

イ）C:X\CYTIDINE> CHI90

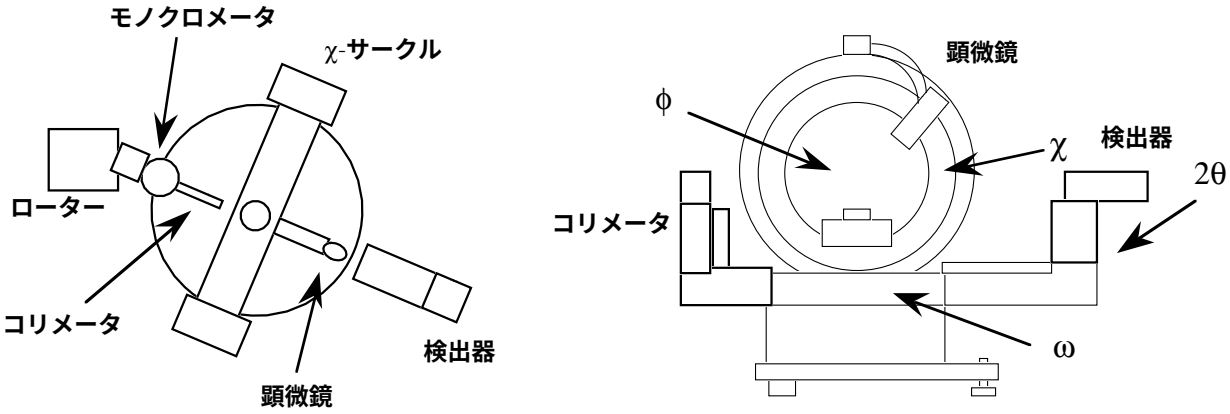
とし、χ=90°とし、この位置でもφ軸の回転によって結晶が中心点からずれないことを確認する。同様な操作を　χ=-90°でも行う。

ウ）φ軸のネジをしめる。

エ）ア、イ）の操作を行い結晶がずれていないことを確認。

オ）ゴニオメータのネジを締める。

カ）C:XCYTIDINE> CHI0 CR　と入力し、望遠鏡でのぞいて、 PHI0、 PHI90、PHI180、PHI270 の各点で結晶の位置を再確認。



4軸回折計ゴニオメータ部 (模式図)

iv) X線の発生

装置のカバーが全て閉まっていることを確認して X-RAY ON スイッチを入れる。

装置上部の赤色灯が点灯し、管電圧・電流がX線出力最低の状態 (20kV, 10mA) まで上昇する (これ以外のときは担当者に連絡)。この状態で装置のカバーを移動させるとX線源が遮断 (安全回路) される。やむを得ずカバーを開ける場合は、DOOR ボタンを押し装置が警報音を出す状態とすること。カバーを元の位置に戻すとこの警報音はやむ。

X線発生器の出力を測定に用いる電圧電流値まで、に交互にゆっくりボタンを押しながら上げていく。

v) 自動測定

a. CTR 画面 (制御用コンピュータ) から、MENU の AUTO モードを選択する。
画面にしたがって、サンプル名、結晶の形、大きさ、データ、測定する範囲、測定スピードなどを入力する (多くの場合デフォルト値で OK)。
入力後 CLOSE を選択。

b. 測定結果を記録するため、LIST ON および PRINT ON を選択する。
マウスで AUTO を選択すると自動測定が開始される。
測定には 普通１日から２日間必要。ただし、結晶が良好でない場合途中で停止することがある。

測定の流れは下記の通りであり、現在進行中のプロセスはモニタに表示される。

SEARCH 決められた条件に基づき、ピークサーチを行い、20-25 個の反射を測定する (この間にモニタにピークプロファイルが次々に表示されるので、各々１つのきれいなピークになっているかをみる。
もし、複数以上のピークがでるようであれば、試料が単結晶ではない可能性が高い。マウスで INTERRUPT を指定すると測定は打ち切られる)。

↓

INDEX 測定された反射を用いて単純単位格子を決定し、各反射の指数付けを自動的に行う。

↓

DELAUNEY Delauney法により、格子変換を行い、格子定数を決定する。

↓

LAUE Laue 対称性の確認を、測定されている反射を基に行う。

↓

LIMIT これまでに確認された情報をもとにデータ収集の条件を決定。

↓

PRECELL データ収集の前に、格子定数の精密決定を行う。

↓

COLLECT 反射強度データの自動収集。

↓

CELL 格子定数の精密決定 (束縛条件での決定を含む) 。

↓

PSI ψ-スキャンデータの収集を行う (吸収補正データの収集) 。

なお、個々のプロセスは独立しており、必要に応じて個別測定も可能である。
ふつう、自動測定の流れに沿って個々のプログラムを実行していく。

５．測定終了の操作

ａ．測定終了後、コントロール画面 (CTR) を終了。
測定終了時、次のファイルがディレクトリに作成されていることを確認する
(C:X\CYTIDINE> dir)。

AFC7R.XTL	(測定に必要な条件を記したもの、ただし、バイナリーで記録されているのでエディタで見ることはできない。)
AFC7R.LOG	(モニタに表示されたものがすべて記録されている。)
COLLECT.OUT	(格子定数などが記録されている測定条件ファイル)
AFC7R.DAT	(H,K,L,Foなどが記録されているデータファイル)
AFC7R.PSI	(吸収補正に使用する PSI データが記録されている)

ｂ．TEXRAY.INF ファイル (格子定数などの入った情報ファイル) の作成
C:X\CYTIDINE> PROCMENU CRと入力すると以下のような画面が表示される。

```
                Cell Contents
Approx. # of non-H atoms in cell     58  (vol/20.0): 52

 Element symbol       Number in formula     Atomic number

       C                    9.00                   6
       H                   13.00                   1
       O                    5.00                   8
       N                    3.00                   7
 The number of atom types id 4  Is the formila correct ?  Y
 Estimated Z value based on (vol/18.0):3.4  (vol/20.00: 3.1

  Number of formula units                      0.0
```

Is the formula correct ? の問に、組成が正しければ <RETURN> キーを押し、違っているときは <N> キーを押す。組成を訂正した後、<CTRL-Z> を実行し、<RETURN> キーを押す。

次にＺ値の問には、１行上に示されている非水素原子数と単位格子の体積から割だしたＺ値 [(vol/18):3.4 (vol/29):3.1] を参考にして正しいと思われるＺ値 (この例では 4)を入力して <RETURN> キーを押す。

```
                Space Group Selection

                 Enter space group number from
                 International tables (Vol A or I)
Space group number   0
Available settings    1-      2-         3-          4-
Setting choice   1
Number of asymmetric units     0
Observed density   0.000
```

空間群画面で、正しい空間群がわかっている場合には International Tables for X-ray Crystallography の空間群の番号を指定するが、わからないときはこの例のように 0 のままにしておき (プログラムが自動的に決定)、<CTRL-Z> を実行する。

```
                Structural Solution library

          MITHRIL   -  general direct methods
          NONE      -  direct methods not run after processing

        Principal authors: C. J. Gilmore, University of Glasgow.
```

この画面は次の解析に VAX コンピュータを用いるためのものであるから、MITHRIL、NONE のどちらが選択されていてもかまわず、 <CTRL-Z> を実行する。

ｃ．測定系コンピュータから解析系コンピュータへのファイル転送

ア）WS (rasa) へのログイン

C:X\CYTIDINE> ftp rasa CR　　コマンド入力はすべて小文字！

Userid for logging in on rasa(texan)? texsan CR

Password for logging in as texan on rasa? xxxxxxx CR

(パスワードは担当者に問合わせること)

User texan logged in. と表示されればＯＫ

Login incorrect. や 'PASS':command not understand と表示されたら bye コマンド

を入力実行し、再び ftp からやりなおす。

イ）ファイル転送

ftp:rasa> ls CR (TEXSAN の下に存在するファイルおよびディレクトリの表示)

ftp:rasa> mkdir cytidine CR (新規に転送先のディレクトリを作成)
ftp:rasa>cd cytidine CR (ディレクトリの移動)
ftp:rasa>pwd CR (ディレクトリの確認)
ftp:rasa>put afc7R.dat CR
foreign file (default afc7r.dat): CR
ftp:rasa> put afc7r.psi CR
foreign file (default afc7r.psi): CR
ftp:rasa> put texray.inf CR
foreign file (default texray.inf): CR
ftp:rasa>bye CR

d．データの 3.5 インチフロッピーディスクへのコピー

1）新しいフロッピーディスクをディスクドライブ (A：であることに注意) にセット
C:X\CYTIDINE> COPY *.* A: CR (すべてのファイルがコピーされる。１枚に入りきらないときは分割してコピーする)

2）測定したデータファイルのハードディスクからの消去
C:X\CYTIDINE> DEL *.* CR (ファイルすべてを消去)
C:X\CYTIDINE> CD .. CR (親ディレクトリに移動)
C:X\CYTIDINE> RD CYTIDINE CR (ディレクトリ CYTIDINE を消去)

3）コンピュータの電源を切る。
C:X>SHUTDOWN

この後、コンピュータ本体、プリンタ、モニタの電源スイッチを切る。

§４　解析方法

１．ログインおよび回折データファイルの確認

SGI Indigo WS のディスプレー電源を投入 (本体の電源には決して触れない)。texsan のアイコンをクリックし、ついで login のアイコンをクリックする。Password に XXXX を入力。

左端の選択メニューのなかの tools のアイコンにカーソルの矢印を入れ、カーソルボタンを押したまま右にドラッグし、現れた選択メニューから、shell を選択する。赤い枠が現れるので、この枠をマウスで移動しクリックすると、shell ウィンドウが開く (矢印を表示したウィンドウ内に移動させて、以下のコマンドを入力する)。

% pwd CR (現在いるディレクトリの確認)
% ls CR (現在いるディレクトリ内に存在するファイル、ディレクトリの表示)
構造解析を行うディレクトリ (例では cytidine) が表示される。
% cd cytidine (構造解析するディレクトリに移動)
% pwd CR
/usr/people/texsan/cytidine と表示される。
% ls CR

解析に用いるデータファイル (afc7r.dat) と測定情報ファイル (texray.inf) はすくなくとも表示されていなければならない)

２．teXsan の起動

% texsan CR (構造解析用ウィンドウを開く)

赤い枠があらわれるので、赤い枠が画面上に納まるようにマウスで移動しクックする)

表示されている結晶の情報 (組成など) に間違いがないか確認。もし変更が必要なときは Parameters をクリックし、再設定。

teXsan の画面で Solve の枠にポインタをいれ、auto solve までドラッグしてマウスを離すと、自動的に解析が進行する (多くの場合これで解ける) 。

上の方法で解けない場合は、MSC Software teXsan (UNIX) 取扱説明書　p.24-p.30 参照

３．グラフィック画面への変更（この段階以降はこの画面を使用）

Model の枠内にポインタを移動し、下方にドラッグして　Graphics edit をクリック。この段階で得られている構造が表示される。axis rotaion、zoom scale などを操作し、この段階でのモデルを回転させ、予想構造と比較検討する。

予想構造と異なっている場合：Solve にもどり解法、パラメータなどを変更し再試行する。

原子名が異なっている場合： name を選択し、このメニュー内で割り当てる原子種をクリックし、ついでグラフィック画面に表示されている位置でクリックすると、その位置が点線で枠組みされる。同じ原子種に属するピークを次々にクリックし、name メニューの Apply をクリックすると、指定されたピークが選択された原子種に変わる。原子の割当を次々に行い、すべて終了したのち、name メニュの　exit をクリックし、この画面を出る。

取り込んだ原子名、座標等を変更する場合は、 Model をクリックして、Menu edit をクリックし、変更したい原子名 (たとえば O17)をクリックする。ついで、変更したい項目をポインタで指示し、クリックして入力。変更後 Exit を入力して元の画面に戻る。

原子パラメータ (座標、温度因子等) の精密化から以下の操作については、MSC Software teXsan (UNIX) 取扱説明書を参照すること。

４．ターミナルセッションの終了

画面の左上でカーソルボタンを押すと、現れるウィンドウの System で左にドラッグし Logout でボタンを離す。または、ウィンドウのないところで、クリックボタンを押し新しく現れたウィンドウの Logout でボタンを離す。新しくウィンドウが現れるので　Yes を入力すると初期画面にもどるのでディスプレーの電源を切る。

５．解析結果のバックアップについて

限られたハードディスク容量を効率よく使うために、解析終了後すみやかにデータのバックアップをすること。残り容量が少ない場合、他測定者の解析に支障をきたす場合がある。

MSC Software teXsan (UNIX) 取扱説明書 p. 6-p. 13 に従って DAT テープにバックアップ (tar 圧縮しファイル転送しても良い) し、データが保存されているファイル、ディレクトリを削除する。

§５　MOLGRAPH（MOL-MOLIS,MOL-CRYS）の利用について

利用を希望する研究室は、担当者に利用希望をお伝え下さい。担当者がユーザ登録を行い、MOLGRAPH を利用可能な状態とし、連絡します。

登録された研究室は、ディスプレイの電源をいれると研究室名のアイコンが表示されるので、このアイコンをマウスの左キーでクリックし、パスワードを入力する。画面の左上のメニューの Tools にマウスカーソルを移動させ、左キーを押したまま右にドラッグし、新たに表示されたメニューの中の shell にマウスカーソルをあわせ、マウスから指をはなすと、shell のウィンドウの枠が表示される。

１．MOLGRAPH の起動

マウスカーソルを shell ウィンドウ内に移動させ、コマンド入力。

rasa 1% mg/molfs CR

MOLGRAPH 画面が表示され使用説明書に沿った作業が可能になる。

２．MOLGRAPH の終了

MOLGRAPH からは、exit をマウス左キーで押すことによって、shell ウィンドウに復帰する。

さらに画面の背景のエリアでマウスの左キーを押すとメニューが表示されるので logout を選択する。たち上げ時の画面に戻ったことを確認して、ディスプレーの電源を切る。

３．注意事項

ディスク管理の都合上、利用者は各研究室単位でユーザ登録を行い、不要になったファイルはそれぞれで消去して下さい (全体的な作業領域が少なくなった場合は、担当者が警告をおこない、さらに強制的に消去します) 。

用いるコンピュータはパソコンではありません、絶対に本体の電源を切ることはしないで下さい。とくに自分の思ったようにならないとき、リセットしようとしないで下さい。そのような場合は担当者に連絡して下さい。

§６　利用上の注意事項

本装置を利用するためには、熊本大学放射線施設使用申請を行い、かつ下記の利用規則に従わなければならない。

単結晶自動Ｘ線解析装置 (Rigaku RASA-7R、Rigaku AFC-6) 使用規則

１．施設の利用は利用申請書を提出し許可された者が熊本大学薬学部放射線障害防止細則に従って使用する。
２．放射線取扱施設訓練および結晶構造解析の経験を有する者が、許可された時間に限り使用できる。
３．使用ノートに使用記録 (立入記録) を行う。
４．マニュアル類の持ち出しは原則として禁止する。
５．付属部品は必ず所定の場所に戻す。
６．モノクロメータ部、ロータ部、波高分析器および計数回路は担当者の許可無く操作することを厳禁する。
７．測定終了後、各利用者は回折および解析データを 3.5'FDD、8mm または DAT に保存し、すみやかに HDD から削除する。
８．装置の故障、Ｘ線障害発生の場合はすみやかに担当者に連絡する。
９．測定解析終了後はすみやかに報告書を担当者に提出すること。
１０．整理整頓を心がける。

§７　おわりに

単結晶Ｘ線回折装置、構造解析プログラムシステム、分子計算支援システムは最新のハードウェアおよびそれを制御するOS (UNIX, MS-DOS) およびLAN (TCP/IP) で構成されています。本解析システムを効率的に利用するために、これらの基礎的な知識を習得しておくことを希望します。

参考書

理学電機株式会社　IBM PC/AT AFC 取扱説明書
理学電機株式会社　RU-H3RHF/V4RHF RINT2000 シリーズ用
横型/縦型ロータフレックス取扱説明書

平成　　年　　月　　日

X線解析装置担当者殿

単結晶自動X線解析装置 (Rigaku RASA7R・Rigaku AFC6) 測定申込書

測定者氏名	
所　　属	
連絡先電話番号 E-Mail アドレス	
物 質 名	
構 造 式	
測定予定結晶の大きさ	
希望測定日	
そ の 他	

平成　　年　　月　　日

X線解析装置担当者殿

単結晶自動X線解析装置 (Rigaku RASA7R・Rigaku AFC6) 使用報告書

測定者氏名				
所　　属				
連絡先電話番号 E-Mail アドレス				
物　質　名				
構造式（ORTEP 図等）				
X線発生強度	電圧	kV	電流	mA
回折計使用時間	年　月　日　時　分（カウンタ：　　）より 年　月　日　時　分（カウンタ：　　）まで 時間　分（カウンタ増分：　　）			
イオンゲージ	使用前	mV		mPa
	使用後	mV		mPa
PC のディレクトリ名	C:\			
WS のディレクトリ名	/usr/people/texsan/			
その他・特記事項 （トラブル等）				

核磁気共鳴装置
(日本電子JNM-EX-270, GX-400, A-500)

薬学部　生薬学研究室　矢原正治；内線 4381
機器分析センター　　武田勝士；内線 4815

§１　はじめに

1945年NMRのシグナルが，Blochら，および，Purcellらにより初めて観察されて以来，NMRの手法，機械の発展は急速に進み，1953年に高分解能プロトンNMRの最初の市販機が現れた．^{13}C核はプロトンに比べ天然存在比が低いため測定が困難であったが，1970年ごろFT-NMRが市販され測定が可能になり，天然物などの構造解析が飛躍的に発展した．現在ではNMRは実験室で不可欠な要素であり，これの助けを借りれば，磁気モーメントを持つほとんど全ての核のNMRシグナルが観測できるようになり．有機化学，天然物化学の分野だけではなく，生化学，医学，無機化学，さらには医療診断（MRI)の分野においても使われている．〒872-0854　大分県宇佐郡安心院町寒水

§２　核磁気共鳴装置とは

2-1　原理，及び，理論[1-3)]

核磁気共鳴(NMR)分光法とは，磁場の中においた試料に電磁波を照射し，試料中の原子核がその特性に基づいて吸収する周波数をその吸収ピーク強度の関数として記録する方法である．原子核スピン（質量数，原子番号のどちらか，または，両方が奇数のもの）を持つものは原則として測定可能である．現在最も良く利用されるのは，核スピン(I) １／２である^{1}H, ^{13}C核である．また，^{15}N, ^{19}F, ^{31}Pなども良く測定される．

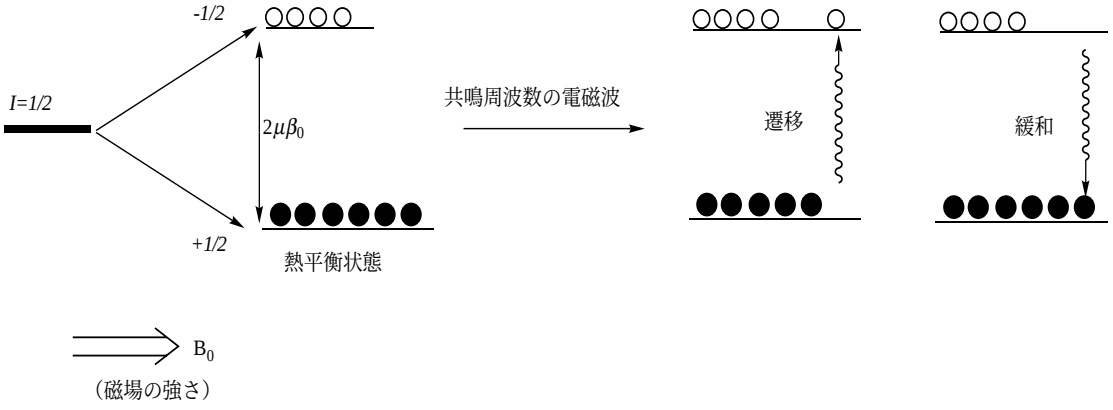


図１　磁場における核のエネルギー状態

^{1}Hや^{13}C核を磁場の中におくと，図１の様に＋１／２と－１／２のエネルギー準位に分かれる．それに電磁波を照射すると，ある周波数で吸収が起こり，少し過剰に分布する＋１／２の準位から－１／２へ遷移が起こる．これを共鳴吸収，または，単に共鳴が起こると言う．

磁気モーメント（μ）はスピンに比例する．すなわち　$\mu=\gamma Ih/2\pi$　の式で現される．ここでγは磁気回転比と呼ばれる定数で，おのおのの原子核について一定である．

それぞれの核は磁場の中でラ-モア歳差運動をしている．これに電磁波を照射すると回転磁場を作り，その周波数が歳差運動の周波数と一致したときに共鳴が起こりエネルギーを吸収する．

同じ種類の核が存在するときは，モーメントを打ち消しあう．しかし，実際の化合物では，同じ種類の核があっても周囲の環境が異なるため，共鳴が起こる周波数は異なる．このようにして起こる共鳴周波数のずれを化学シフト（ケミカルシフト）と言う．このずれは，プロトンでは主磁場の１００万分の１のオーダーに過ぎないが，このわずかなずれを精密に測定して，化合物の情報を得るのがNMR分光法である．

2-2　測定装置および測定法

NMR測定装置は，超電導マグネット，磁場に挿入された試料に照射する電磁波を発生する振動磁場発生装置，共鳴エネルギーを検知する検出装置，それらをコントロールするコンピュータ，試料を回転させるコンプレッサー，データを書きだすために必要な，プリンター，さらには，超電導磁石を維持するために必要な，液体窒素を造る，自動液体窒素供給装置からなる．

参考文献

１）実用NMR　通　和夫，竹内敬人，吉川研一，講談社サイエンティフィク
２）第２版機器分析のてびき（１），芝　哲夫ら，化学同人
３）^{1}Hおよび^{13}C NMR概要，R.J.Abraham and P.Loftus著，竹内敬人訳，化学同人

測定法は，学生が現在自由に測定を行っている，EX-270について簡単に記す．
（400 MHz, 500 MHz NMRの操作法も大体同じであるが，コマンドの位置，省略のしかたが少し異なるので注意）

270MHz　NMR溶液用使用説明（初心者編）

詳しいことはマニュアルをご覧下さい

◆測定準備

スイッチON

モニター
プロッター，プリンター
サブオペレーション
コンプレッサー，ドライヤー

汚れをきれいにふき取ったサンプルチューブをローターセット，
サンプルをＳＣＭの入り口に入れる．
（注意書きを良く読んでください）

メモリーエリアの図を頭にいれてから以下のことを行なってください.

「１Ｄ－ＮＭＲ」

^{1}H-NMR 標準測定

1. MEに、NONと入力。　　[13C COM ME= COM, DEPT-135 (3/4J) ME=DEPT]
[RDM]

次のことを確認。

EX=NON
OBN=1H
PO=32768
PW1= 4.9 μsec　(45･パルス)
1H: PW1=4.9μsec(1Hの45･pulse), 13C COM: PW1= 4.1μsec(13Cの45･pulse),
DEPT: PW1=8.2μsec, PW2=20μsec, PW3=30μsec

2 . Sample溶媒セット。
SL　CDCL3 （自分の測定溶媒, D2O, C5D5N, ACETN, DMSO, CD3OD）
[LDS]　　（サンプルのＤロックの波長をセットする．）
DF, CO　を自分の化合物に変える．

3 . サンプルをＳＣＭの中央（測定位置）にセット。
サブオペレーションユニット AUTOのSwitchを、押す。
＊sampleが load, spin, AUTO LOCK ON, SHIM ON となる．

温度可変の測定セット
TENP XXX, TCON 0, TON (VT ON) サブオペレーションユニットの温度が点滅する．（温度が一定になるまで測定できません）（SHIMも再度合わせてください）

4. 積算回数の設定。
TI　XXXX
XX= 4の倍数が好ましい．（切りのいい数字でも良い．例えば 50, 1000, 10000）

5. コメント
CO　XXX
コメント64文字以内。（スペースを入れずに記入．何を使用してもよい）

6. 積算開始

AG (測定途中を見たいときは　UPキーを押し，PARMキーを押すと測定状態が分かる．）

積算終了後、DO

（積算の途中でスペクトルを見る：FAとする．（ACエリアのデータをDCに移し，FT変換する．）

7. データ転送（コピー）

DF [100,1X0]XXXXX

9文字以内。（アルファベットおよび数字のみ）

WA (AC エリアのデータがDISKの[100,1X0]番地に書き込まれます。）

DISKからデータを呼び出すとき.

（１）DF [100,1X0]XXXXXXXXX　RDD (DSエリアにデータが呼び出される）

（２）ＦＴ　（DSエリアのデータなので　ＦＴである）

8. フーリエ変換

FA (ACエリアのデータをＦＴ変換する）

9. 位相補正

AT （自動でP1, P0を合わせ位相を補正する）

AR (all return)

YG　ピークの高さ補正。

P1　P0

10. スペクトルの位相合わせ。

合っているとき OK。

11. REFの設定。

(a)EX

*KY TMS化学シフト値　0.00を入力。（D2Oの時は，例えば4.72を入れる．または，自分の決めた数字を入れる）

(b)M1

ジョイDisk（----）でTMSピークの頂点に合わせる。

(c)TOP

(d)REF

(e)SCL　表示とスケールの確認。

SKP (全ポイントと，1／3のポイントの図を交互に出す）

12. Baselineの補正。

自動　ATD

13. DATA Reduction

YG　　＊KY見やすいピーク高にする。

BA　　Baseline set（普通は　0　）

NL　　Baselineとの幅をノイズ位にする。

TH　　最小ピークの頂点よりやや低めにあわせる。

　　プロッターのスイッチがONであることを確かめる.

RDU

14. 積分の設定、書き出し。

自動　ATI（TMS，溶媒も積分されるので，不要の部分を消すことが必要である）

マニアルで行なうとき

INT

CLR

YAD

M1　ジョイDisk（----）でカーソルを積分領域の左端設定。

M2　ジョイDisk（----）でカーソルを積分領域の右端設定。

SET

YZ

B0

RS

B1

RS

　＊ベースラインが水平でないとき

　[B0] ノブで水平になるように。（ほんの少し右上がりになっているほうがよい）

　＊トップラインが水平でないとき

　[B1] ノブで水平になるように。

INC

　M1～INCを繰り返す。

OK

　[BLO （標準にしたい積分の番号を入れる），　SI　1 (1H分)，　REF，　OK]

15. 書き出し

INF (INT，FINにセットした範囲が画面上に出る）

（XE= 2700を入れると10ppmの拡大となる．）

YAD　YGで、スペクトルの大きさを調整する。

（必要なピークの最大のものをYADするとよい）

YZ　（積分値の最大のものを95%にする）
DS1　（パラメータを画面の右すみにだす）　DS2（パラメータを消す）
CHG　（下にケミカルシフトを入れる．書き出し用紙サイズがMSZではだめ）
PL　（画面が青になる．この時はなにもできない）
スペクトルを書きながら他の仕事をしたいときは次ぎのようしてください．
DOキーを押す．　ＨＣＰパターンにDOキーを押してはいる．　5PVを押す．
（ＰＬと同じものを書いてくれます．）
（他に，3P，4P，PR，1P, 2P，5P，5P/G2. PSQ等があります）

測定が終わったら、サブオペレーションの　SPIN OFF，LORD/EJECT を押す。
DO で初めの画面に戻しておく。
サンプルをマグネットから取り出す．ふたをする．
最初入れたスイッチを全てoffにする．
不明のときはHELPキーを押してください．
分からないときは，マニュアルを見て下さい．

EX-270（個体），GX-400，A-500の測定法は，責任者にお尋ね下さい．
また，セカンドターミナルによるデータ処理に関しましても，責任者にお尋ね下さい．

§３　仕様

EX-270
測定可能な核種：^{1}H，^{13}Ｃ　（５Φプローブ）
液体（^{1}H，^{13}Ｃ），個体（^{13}Ｃ）が測定できます．

GX-400
測定可能な核種：^{1}H，^{13}Ｃ　（５Φプローブ），多核（１０Φマルチプローブ）
液体での測定ができます．

A-500
測定可能な核種：多核（５Φマルチプローブ）
FG-HX（５Φプローブ）
液体での測定ができます．ＦＧでの測定ができます．

セカンドターミナル
DEC-3000
EX-270, GX-400, A-500と接続されており，各データの処理が素早くできます．

データ転送に関して.

Fetchを用い，データの転送が可能です．また，MAC FIDでパソコン上での１Ｄデータのフーリエ変換が可能です.

§４　利用上の注意

ペースメーカを使用している人は近づかないで下さい.
サンクル管は研究室で外をきれいにふいてNMR室に来てください.
サンプルは奇麗に拭いてから、マグネットへ.
手も奇麗に洗って来てください。（スピンナーが汚れます）.
衣服のゴミはきちんとはらって入室してください.
（金属がついていると大変です）

入室について
各自測定室にはいる前に
＊手をきれいに洗い，汚れた白衣を脱ぎ，または，きれいな白衣に着替える.
＊常磁性の金属を含物，例えば，クリップ，ステップラー針，カッター等を服のポケットなどに入れていないか，また，付いていないか，外で十分に確認し入室する.
＊カード，時計等を身に付けて入室しないこと.
＊服などにホコリ，鉄錆などが付着していないよう十分注意.

サンプルについて
＊サンプル管はまっすぐなものを使用する．シムが合いにくいときは，管が曲がっていることがあります（メガ数が大きくなるほど品質の良い測定管をお使いください）
＊サンプル管のヒビ，キズ，汚れには十分注意.
＊サンプルの中にゴミが入っていないように，濾過してサンプリングを行なうこと.

サンプル管の外の汚れの取り方.
キムワイプなどで試料管の外，底の汚れをきちんと取り除くこと.
特に底部は注意してきれいにすること.
さらに，ローターにセットする前に，もう一度きれいにふき取ること.
（試料管が汚れているとプローブの中が汚れ，良いデータが出せなくなります．）

試料管のローターへのセット
＊４ｃｍ以上の時（多すぎると分解能（シム）が上がらないので注意）：
　コイルセンターより下２ｃｍにセットする．（SHIM FILE : SM4)
＊３～４ｃｍの時：
　コイルセンターより下を０．５～１mm位短くしてローターにセットする.

（溶媒の中心より１mm程下にセンターを置く）
＊３ｃｍ以下の時はSHIMが悪いので注意．（2.3mm位までは可能です）

試料をマグネットに入れる時
＊試料が既に入っていないことを確かめる．
＊コンプレッサー，ドライヤーのスイッチがONになっていることを確かめる．
＊試料出し入れ口より空気がでていることを手だ確かめる．
　また，試料を入れたとき浮く感覚がある．
＊試料は垂直に出し入れすること．

§５　応用例

年間７０００件以上の測定が行なわれている．それらは，タンパク質，核酸，配糖体，脂質，芳香族化合物，テルペノイド類などの天然物，また，各種不斉，立体異性を持った合成化合物などである．これらの構造解析には現在では普通になったFG（フィールドグラジュアエント）のプローブが各種二次元NMRの測定で活躍している．また，^{13}Cの個体NMRで薬品の安定性，結合性などが論議されている．
さらに，^{31}Ｐ，重金属の測定も時間が許すかぎり行なわれているが，^{1}H, ^{13}Cの測定が多くマシンタイムが取れないのが現状である．
今後，個体，多核(N, P, Fe, Ptなど）および，タンパク質の測定が増えてくるのではないかと考え，対処が望まれる．

核磁気共鳴装置

(日本電子 JNM-AL-300)

薬学部　生薬学研究室　　矢原正治；内線 4381
薬学部　薬品製造化学研究室　岡本良成；内線 4815

§１　測定方法

［NMR室入室の注意を十二分に守ること］

^{1}H-NMR の測定

１．コンプレッサーとエアードライヤーの電源を入れ，サブオペレーションユニットを表示させる．
２．モニターとプリンターの電源を入れる．
３．サンプルを SCM にセットする．（セットの仕方は 270 MHz NMR と同じ．）
４．測定溶媒を設定する．
　１）SAMPL Command の [SLVNT] をクリックする．
　（溶媒選択ウインドウが表示される．）
　２）使用する溶媒を選択して，[LDSET] をクリックする．
５．メニューファイルを設定する．
　１）MENU Command の [MENUF] をクリックする．
　（メニューファイル選択ウインドウが表示される．）
　２）non. par を選択して [RDMNU] をクリックする．
　３）MENU Command の TIMES に積算回数を入力する．
　４）MENU Command の COMNT にコメントを入力する．
６．サンプルのロードと分解能調整．
　１）SAMPL Command の [Auto set] をクリックする．
　サンプルがプローブにロードされ，ロックとシムの自動調整が行われる．
　シムの調整が終わると SAMPL 画面の一番下の表示が次のように変わる．
　（調整中は水色が点滅する．）

７．積算の開始．
　１）Accumulation Command の [AGACM] をクリックする．（UPDIS 画面が表示される．）
　＊１　積算中のスペクトルが見たいときは UPDIS 画面で [MVFT] をクリックする．1D Pro. 画面が表示されるので，データ処理のやり方を参考にしてデータを処理する．

もとに戻るときは をクリックする．

＊2　積算を途中でやめたいときは UPDIS 画面で CANAQ をクリックする．

2）積算が終了すると自動的に SAMPL 画面に戻る．

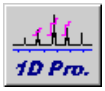
8．FID の保存（FID を保存しない場合はやらなくてもよい．）

1）File メニューから Save を選択する．（データ保存ウインドウが表示される．）

2）保存する場所を選択し，ファイル名を入力した後 保存(S) をクリックする．（ファイル名の後に，ファイルの種類を示す拡張子 .als が自動的につく．）

データ処理

1．フーリエ変換と位相補正

1）  をクリックする．

2）画面左上のウインドウ関数が Exponential，BF が 0.12 であることを確認する．（ウインドウ関数を変更したときは FFT をクリックする．）

3）画面右下の Auto をクリックして位相を合わせる．
P0，P1 を使ってマニュアルで合わせてもよい．
＊1 PP の位相を P0 で合わせる．
＊2 PP からいちばん離れたピークを P1 で合わせる．．

4）位相があったら OK をクリックする．

2．ベースラインの補正

1）Commands メニューから Base line correction を選択すると画面にベースライン補正用ツールバーが表示される．

2） Auto をクリックする．
マニュアルで補正するポイントを設定してもよいがAuto の方がきれいにできる．

3） をクリックするとベースライン補正の確認のダイアログが表示される．

4） OK をクリックするとベースラインの補正が実行される．

3．リファレンスの設定

1）Commands メニューから Refference set を選択すると画面にリファレンス設定用ツールバーが表示される．

2） Auto をクリックする．（TMS 信号（青い線）またはロック溶媒の信号（赤い線）を基準としたケミカルシフトが自動的に設定されスケールが表示される．）
マニュアルで設定するときは Tms をクリックした後，基準にしたいピークをマウスでドラッグする．（ドラッグした範囲で最大のピークが基準ピークとして設定される．EX にケミカルシフト値を入力する．）

3）設定が終了したら をクリックする．

4．ピークリダクション

1）Commnds メニューから Peak picking を選択すると画面にピークリダクション用ツールバーが表示される．

2） をクリックする．
（自動的に TH，NL，BA が決定されピークリダクションが実行される．）
マニュアルでリダクションする場合は，TH，NL，BA の位置をそれぞれ決めた後， をクリックしてピークリダクションを実行する．
（マニュアルで設定したほうが良い．）
3） をクリックしてピークテーブルを表示させる．
4）File メニューから Printer Setup を選択する．
（プリンタの設定ウインドウが表示される．）
*サイズが A4 210 x 297 mm になっていることを確認する．
*印刷の向きが縦になっていることを確認する．
*用紙サイズの変更方法
Ⅰ．サイズの をクリックする．（用紙サイズの一覧がポップアップする．）
Ⅱ．A4 210 x 297 mm を選択する．
5） をクリックする．
6）プリンタに A4 の用紙をセットする．
7）ピークテーブルの をクリックする．
ピークテーブルには，Pos と Int だけしか表示されないが，プリントアウトすると 270 MHz NMR と同じピークテーブルが打ち出される．
（PPM，INT，FREQ，POSITION，BAR GRAPH）
8）プリントアウトが終了したらをクリックする
5．積分の設定
1）Commands メニューから Integration を選択すると画面に積分用ツールバーが表示される．
2） をクリックする．（自動的に積分曲線が表示される．）
マニュアルで積分を行うときは をクリックして必要なピークをマウスでドラッグする．
3） をクリックし，いちばん大きな積分曲線のところでマウスをクリックする．
（いちばん大きい積分曲線が画面の 95 % になる．）
4）B0 と B1 で積分曲線の位相を補正する．
5）SI に基準とする積分値を入力して をクリックし，基準とする積分曲線のところでマウスをクリックする．
6．マルチビューの設定（マルチビューが必要ない人はやらなくてもよい．）
1）Commands メニューから Multi view を選択すると画面にマルチビュー用ツールバーが表示される．
2） にＸ軸とＹ軸の拡大率を入力する．
3） をクリックして拡大したい範囲を囲む．（ポインタの横に枠が表示される．）
4）書き出す場所を設定する．（緑色の枠の中に拡大したスペクトルが表示される．）
7．NMR スペクトルの書き出し
1）File メニューの Print を選択する．

（プリントパラメーター設定ウインドウが表示される．）

2）Print Selection の中からプリントアウトする項目のチェックボタンをクリックして ☑ を表示させる．

3）[Print Setup] をクリックする．（プリンタの設定ウインドウが表示される．）
File メニューから Printer setup を選択してもよい．
*サイズが A3 297 x 420 mm になっていることを確認する．
*印刷の向きが横になっていることを確認する．

4）[OK] をクリックする．

5）プリンタに A3 の用紙をセットする．

6）Print Parameter の [Print] をクリックする．

補足）

Ⅰ．プリントパラメーター設定ウインドウで [Page Preview] をクリックするとプリントアウトするチャートのイメージが表示される．

Ⅱ．プリントパラメーター設定ウインドウで [Font Set] をクリックするとプリントアウトするフォントの種類と大きさを変更することができる．
（ただし変更した場合はもとに戻しておくこと．）

Ⅲ．プリントパラメーター設定ウインドウで [PRTBL] をクリックするとプリントアウトするパラメーターの内容を変更することができる．

測定の終了

1．

をクリックする．（データ保存の確認ダイアログが表示される．）
フーリエ変換したデータを保存する人は [はい(Y)] を，保存しない人は [いいえ(N)] をクリックする．
[はい(Y)] を選択するとデータ保存ウインドウが表示されるので，保存する場所を指定し，ファイル名を入力して [保存(S)] をクリックする．

2．SAMPL 画面に戻るので SAMPL Command の [Eject] をクリックする．

3．サンプルを SCM から取り出す．

4．モニタとプリンタの電源を切る．

5．サブオペレーションユニットの表示を消し，コンプレッサーとエアドライヤーの電源を切る．

^{13}C-NMR の測定

基本操作は ^{1}H-NMR の測定と同じである．

^{1}H-NMR と異なる点

１．使用するメニューファイル
COM の測定の時は bcm.par を選択する．
DEPT の測定の時は dept.par を選択する．

２．フーリエ変換するときの BF の値は 1.00 にする．

３．マルチスペクトルの設定
マルチスペクトルで呼び出すデータはフーリエ変換されたものでなければならないので，COM を測定しデータ処理をした後，必ずそのデータを保存しておくこと．

１）Commands メニューから Multi spectrum を選択するとマルチスペクトル設定ウインドウが表示される．

２）[2] をクリックするとファイル選択ウインドウが表示される．

３）呼び出すファイルを選択し [開く(O)] をクリックする．
（呼び出したスペクトルが赤色で表示される．）
このとき必ずフーリエ変換した後のファイルを選択すること．
FID のファイルを選択すると Alert が表示される．

４）ＹゲインとＹシフトを調整する．
すべてのスペクトルに対してＹゲインを調整するときはツールバーのＹＧで調整する．
後から追加したスペクトルだけを調整するときはマルチスペクトル設定ウインドウの中にあるＹＧで調整する．
（複数のスペクトルを追加したときは調整したいスペクトルの横のラジオボタンをクリックしてから調整する．）
後から追加したスペクトルのＹシフトはマルチスペクトル設定ウインドウの中にある Shift の [↓][↑] で調整する．

５）すべての設定が終了したらマルチスペクトル設定ウインドウの中にある [Exit] をクリックする．
赤色で表示されたスペクトルは消えてしまうがそのまま操作を続けること．
マルチスペクトル設定ウインドウが表示された状態ではプリンタでの書き出しができない

４．スペクトルの書き出し
プリントパラメータ設定ウインドウで MultSpec のチェックボタンをクリックして ☑ を表示させる．

不必要なマルチスペクトルの削除

１）マルチスペクトル設定ウインドウの不必要なスペクトルのファイル名入力ボックスをダブルクリックする．（データファイル名の表示が反転する．）

２）キーボードの Delete キーを押す.
３）キーボードの Enterr キーを押す.

§２　仕様

測定可能な核種：１H，１３C　（５φ プローブ）
液体での測定ができます.

§３　利用上の注意

・Ｐ４３～４４の利用上の注意を守ること
・分からないときは勝手に操作をしないで，岡本先生（4624）または，矢原（4381）にお尋ね下さい.

原子吸光分析装置
(PERKIN ELMER SIMAA 6000)

機器分析センター　城戸　裕；内線 4808

§１　はじめに

原子吸光の現象は太陽の連続スペクトルの暗線，いわゆる Fraunhofer 線として19世紀から知られていたが，化学分析法として提唱されたのは1995年 Walsh によってである．吸光光度法に比べると，選択性がよく，高感度であるために金属元素の分析に最もポピュラーな測定方法となり，環境分析，工業分析，臨床分析など多くの分野で広く採用されています．原子吸光法は原子化の方法によって，フレーム法とフレームレス法に分類されます．

本センターに設置されている機器はフレームレスの多元素同時測定可能な SIMAA 6000 である．この機器は４元素まで同時測定が可能です．

§２　原理

2 - 1　理論

原理的には原子吸光法というのは基底状態の金属原子が光を吸収して励起状態の金属原子になる過程を観測するものである．金属原子による吸収スペクトルの幅は溶液中の化学種と比べ非常に狭く，このため原子吸光法は吸光分析法よりも選択性が非常によくなる．

原子吸光光度計は，測定原理から下図に示す構成からなっている．

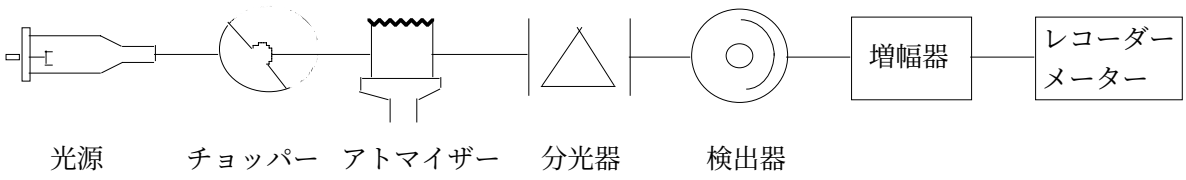


Fig. 1　原子吸光光度計の構成

原子吸光に最も一般的に用いられる光源としては封じ込み型の中空陰極ランプ（HLC）と無電極放電管（EDL）の２つのタイプです．SIMAA 6000 には無電極放電管が用いられます．原子化はフレームレスの場合，黒鉛管あるいはタンタル，タングステンフィラメントなどに電流を通じ，発生するジュール熱により行うため数十μl の試料量で高感度の測定が可能である．

試料注入後，電流を通じ100～300℃で乾燥，ついで500～800℃になるように電流値を上げ灰化する．原子化は1500～2800℃に上げて行い，この時の吸光量を測定する．元素によってはフレーム法により2～3桁感度が高い．試料中に有機物が存在するとバックグランドの原因になったり，炭化物を生成して目的元素を吸着するなどの障害を起こすので，灰化処理で有機物を処理しなければなりません．灰化の方法としては高温灰化，低温灰化，湿式灰化の３通りがありますが本センターには湿式灰化の装置としてマイクロウェーブ式サンプル前処理装置（MDS-2000）を設置しております．

2 - 2　方法

１．システムのセットアップ

① スイッチを入れる

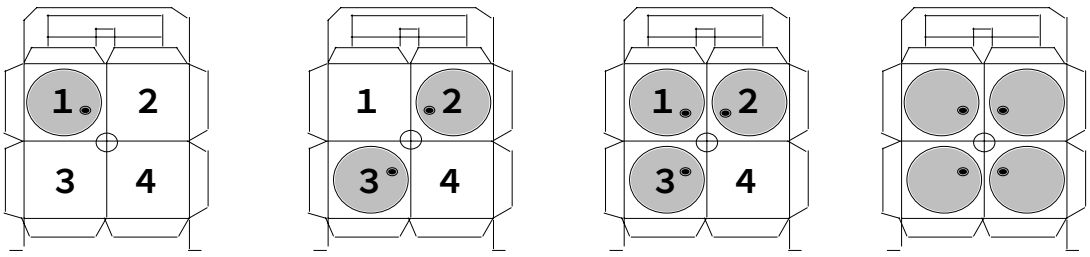
冷却システムの冷却水位が MAX のマーク位置にあることを確認する．

部屋の換気装置のスイッチを入れ，ガスの供給装置のスイッチを入れて，圧力を3.5 bar にセットする．冷却システムの電源スイッチをＯＮにして分析中はスイッチはＯＮのまま，コンピュータのスイッチを入れ，装置のスイッチを入れ AA Win LabAnalyst アイコンをダブルクリックしてAA Winlab をスタートさせ，Menus and シールバーをクリックして画面を消す．

② ランプのセットと調整

ランプカセットを交換し，ランプカセットにランプを取り付ける．

ランプを４個使用しない場合は，下図の位置にセットして下さい．



ランプ１個の場合　１番にセット　　ランプ２個の場合　２，３番にセット　　ランプ３個の場合　１，２，３番にセット　　ランプ４個の場合

ランプを接続したのち，ランプの調整を行う．

③ ガス排出装置をセットする

④ グラファイト・チューブを交換または調整を行う．

グラファイト・チューブを交換した場合は必ずクリーニングが必要です．

⑤ オートサンプラーをセットする

リンス装置のセッティングとアームの調整を必ず行う．

サンプルカップ内及びグラファイト・チューブ内のピペットチップの挿入深さを調整する．

2．メソッドを作成する

① カスタマイズド・メソッドをメソッド・エディターを使用して作成する.
② パラメーター値の変更あるいは修正を行う.
③ メソッドをチェックする.
④ メソッドを保存する.

3．サンプル情報ファイルを作成する／変更する

① ファイルの作成あるいは変更を行う.
② 表示単位を W/W か W/V にする.

4．分析条件を最適化する

① サンプルが正しく注入されているか確認する.
② 乾燥ステップのプログラムを確認する.
③ 灰化温度と原子化温度を設定する.
④ 読み取り遅延時間と読み取り時間を設定する.
⑤ 検量線を最適化する.
⑥ ピーク形状と測定精度をチェックする.

5．分析を実行する

6．システムを停止して電源を落とす

§３　装置の仕様・付属設備

（1）仕様

機種	：PERKIN ELMER SIMAA 6000 多元素同時グラファイトファーネス原子吸光装置
波長範囲	：190～860 nm
スペクトルバンド幅	：0.2 nm
設定温度	：最高2000℃
注入量	：1～99μl

（2）付属設備

マイクロウェーブ式

サンプル前処理装置	：CEM 社　MDS-2000
AD-4 型電子天秤	：PERKIN ELMER

§４　利用上の注意事項

① 心臓ペースメーカやその他の人工臓器を使用している者はファーネスに0.6 m 以上近づかないで下さい.

② 紫外線源（加熱状態のグラファイト・チューブ，中空陰極ランプと無電極放電管）を見る時は必ず紫外線吸収メガネを着用して下さい．
③ 分析中は有毒物質，金属蒸気およびオゾンが排出される可能性がありますので室内を十分に換気して下さい．
④ グラファイト・ファーネスは室温に下がるまでは絶対に手で触れないで下さい．
⑤ 試料中に有機物が存在する場合，灰化処理で有機物は処理して下さい．
⑥ 個体，又は液体サンプルは水系溶液に変えて下さい．ネブライザーの詰まりの原因になります．

§５　応用例

環境分析としては大気中の水銀，河川水中の Cu，Zn，Cd の定量，海水中の水銀など種々の金属分析に，また工業分析としては金属の成分分析や鉄鉱石の重金属分析など，また食品分析やヒトの血液，尿，頭髪などに含まれる微量金属の分析などの臨床分析に応用されている．河川水中の銅，亜鉛の分析法例を Fig. 2 に示す．最後に本装置で同時分析が可能な元素の表を Fig. 3 に示す．

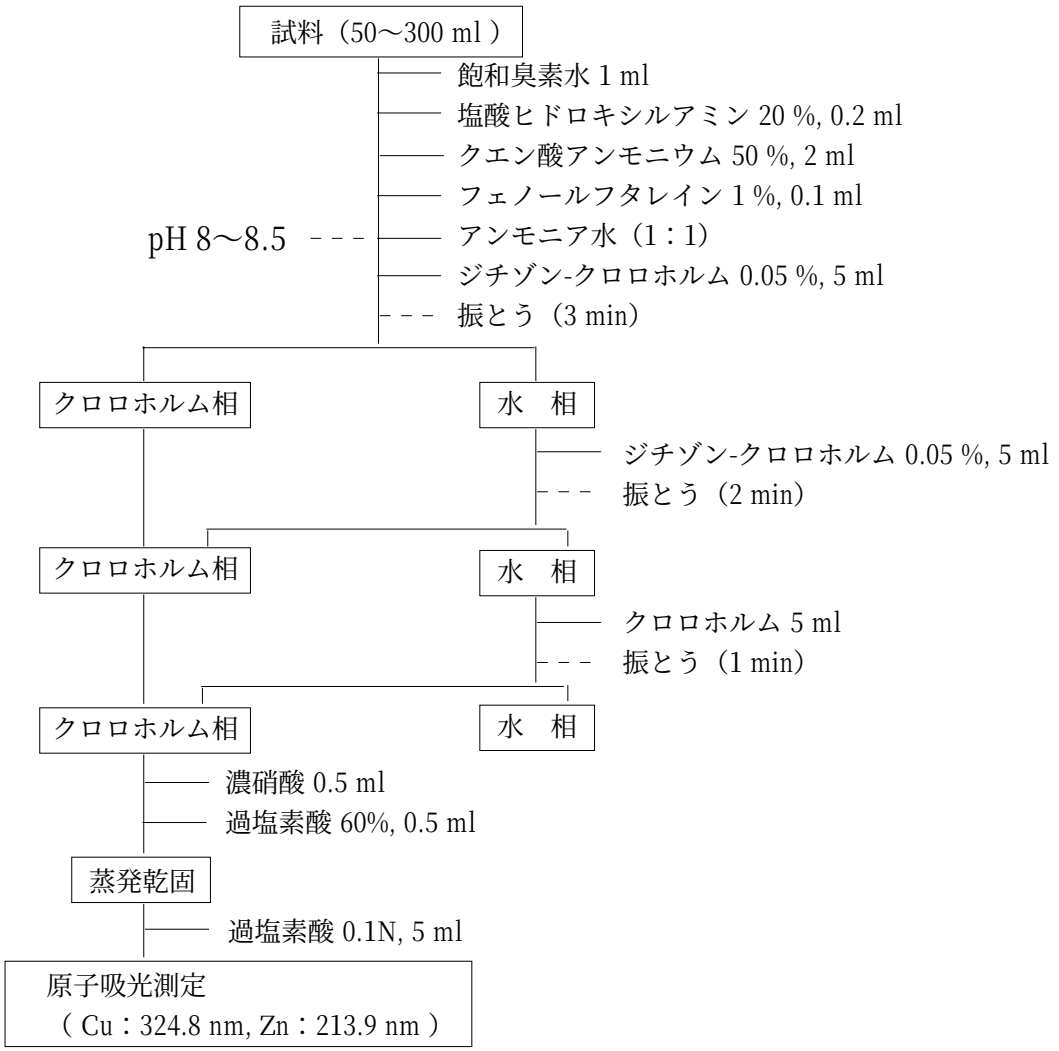


Fig. 2　低汚染の河川水中の銅，亜鉛の分析法

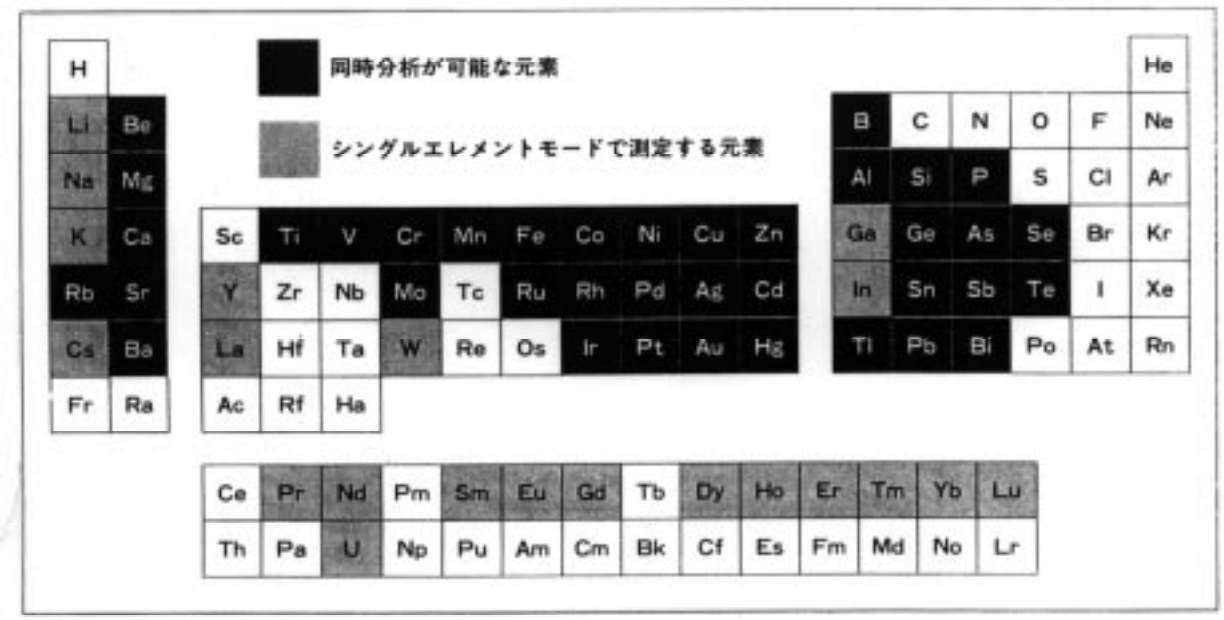


Fig. 3　SIMAA 6000対応の元素

参考文献

機器分析入門：日本分析化学会　九州支部編　南江堂1990年

電子スピン共鳴装置
（日本電子 JES-TE200）

薬学部　薬品物理化学研究室　黒崎博雅；内線 4315

§１　はじめに

１.１　ESRとは

ESRはElectron Spin Resonance の頭文字をとった略語で，日本語では電子スピン共鳴という.

ESRは物質中にある不対電子を含む試料を数千ガウスの磁場中において不対電子のスピンの遷移に伴うマイクロ波（周波数 9.4 GHz，波長 3 cm 程度の電磁波：Xバンド)の吸収による共鳴現象を観測するものです．すなわち，ESRの対象は不対電子を持つ常磁性物質と云うことになります.

電子スピン共鳴装置を用いた研究は生体から半導体まで幅広い分野で使用されている。例えば、医学薬学の分野では、活性酸素種や金属含有蛋白質および酵素などを対象として研究されてます。

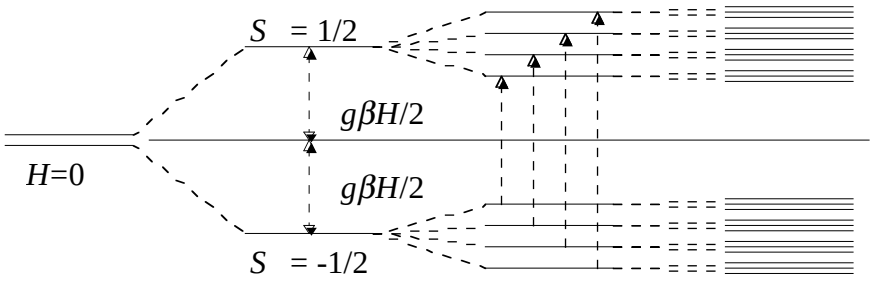
１.２　ESRの対象となる物質

・不対電子分子：NO，NO_2など
・三重項分子：O_2
・遷移金属イオン：dまたはf軌道に奇数個の電子をもつ物質でFe^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}
・有機フリーラジカルイオン：ニトロキシドラジカル，DPPHなど

§２　ESRの原理

不対電子を磁場の中におくと，スピンのエネルギー($Sz=\pm 1/2$)が分裂する（図１）一定振動数νのマイクロ波を試料に照射しながら磁場Hを掃引すると，ゼーマン分裂の大きさDEがマイクロ波のエネルギー$h\nu$に等しくなったとき電子スピンの向きが反転して，$Sz=\pm 1/2$ のエネルギー準位間の遷移が観測されます(h はプランク定数）.

DEは分子が持つ磁気モーメントの大きさ $|\upsilon|=g\beta\sqrt{3/2}$ と磁場の強さHに比例し$g\beta H$と表される．βはボーア磁子 9.2741×10^{-24} J・T^{-1}である．またgはg値とよばれ，自由電子では，2.0023となります.

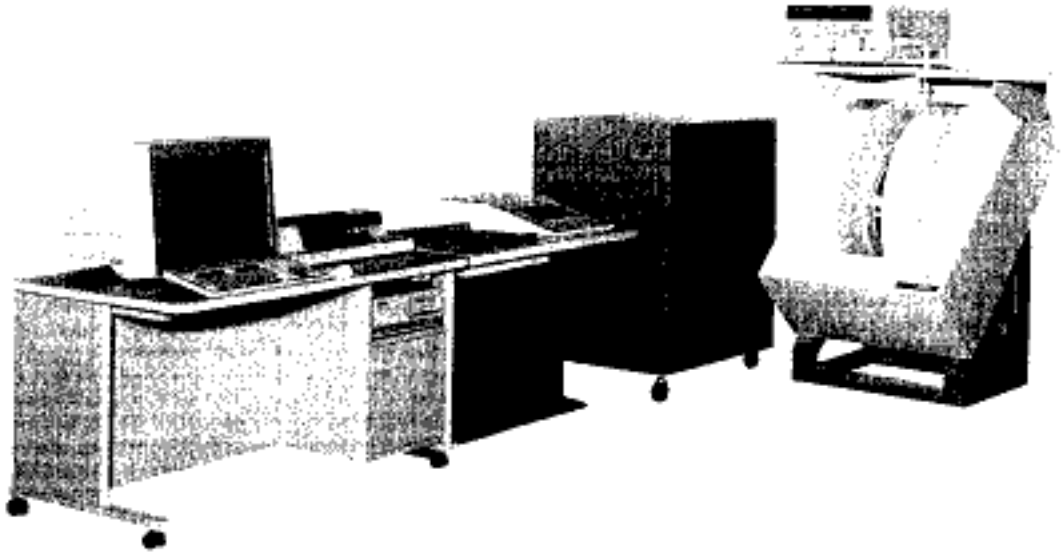


(a)ゼーマン分裂　　(b)超微細分裂　　(c)超微細分裂

図１　S=1/2，$I1$ = 3/2，$I2$ = 1におけるスピンエネルギー準位

§３　構成

本学分析センターには日本電子製JES-TE200型電子スピン共鳴装置設置されています．本装置（図２）は，マイクロ波ニュット，空胴共振器，電磁石，励磁電源，分光計，温度可変コントローラ，周波数カウンタ，恒温冷却装置およびデータ解析システム（スペクトルの加算，減算，ベースライン補正，積分およびスピン濃度の計算，スムージング，信号拡大縮小，g値の計算，等方性，異方性シミュレーション）より構成されています．



§４　ESR測定方法

４.１ESR測定前の準備

１．試料管をホルダに挿入し，さらに試料管固定器具にいれて試料管が落ちないよう程度に軽く止める．図３(a)

２．試料管の長さ設定治具に１．で組立た試料管を合わせ必要な長さに設定してからホルダを試料管器具にしっかりとねじ込み固定する．

例えば，常温測定の場合には図３(b)のように「R.T.」の位置に試料の中心を合わせると図(c)のような位置に試料管が入るように設定されています．

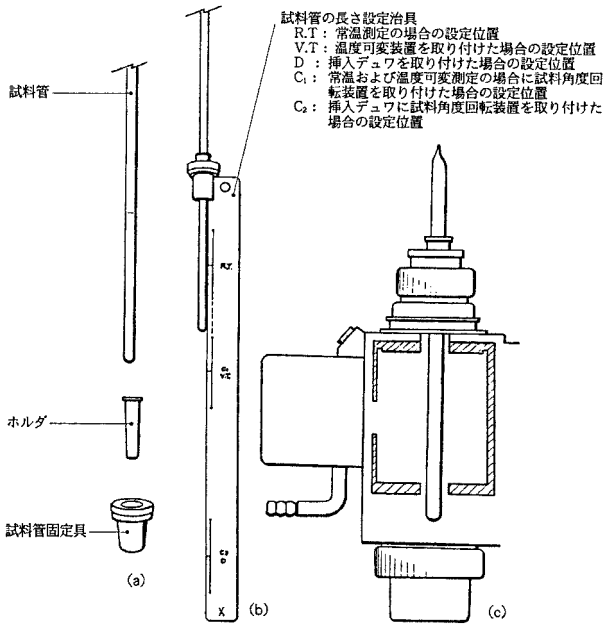


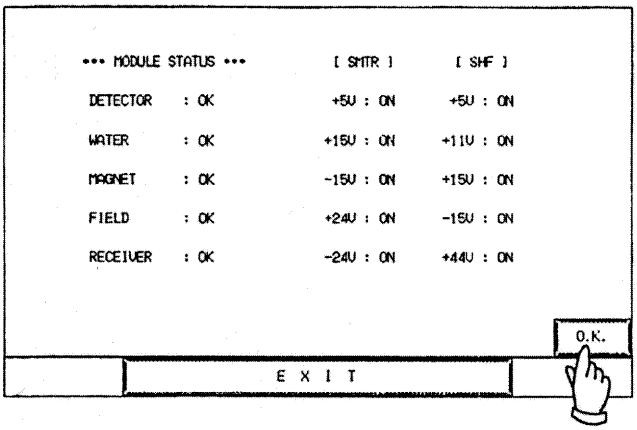
図　3

4.2操作方法

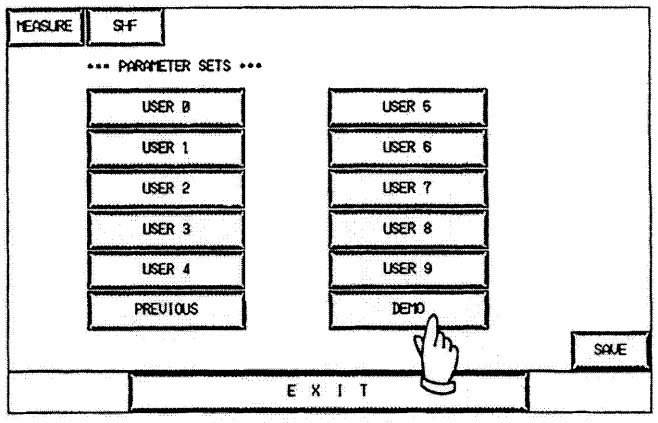
ここでは、基本的な操作のみを説明します。応用操作については装置付属の取り扱い説明書を参考にしてください.

4.2.1　始動

1．配電盤のスイッチをONにする.
2．恒温冷却装置のスイッチをONにする.
3．マグネット電源のpowerスイッチがONになっていることを確認する.
異常時，点検時以外は常時ONままにしておきます.
4．分光計のpowerスイッチをONにする.



分光計に内蔵されているコンピュータによって，装置の環境が自動的にセルフチェックされています（約５分）.

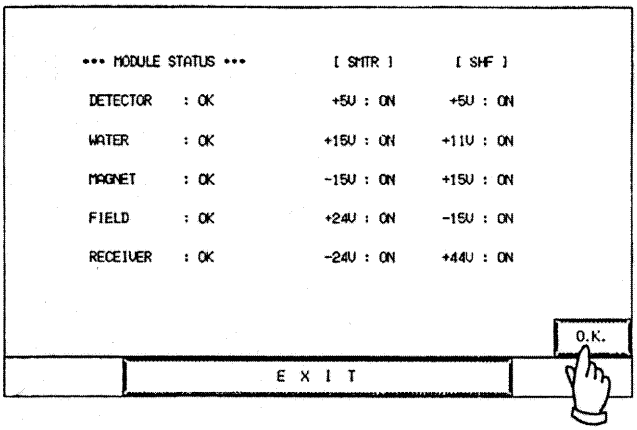


すべての項目が「OK」または「ON」になったら，装置は正常に作動していることになります．もし，「NG」または「OFF」がでている場合や「SMTR error」や「SHF error」がでている場合は「セルフチェック画面-NGの対処法」を参考にしてNGの項目を確認してください．確認が終了してら電源をOFFにし，１０～２０秒後に再度電源をいれてください．

４.２.２　半自動測定(Semi-Auto機能)を使って測定する方法

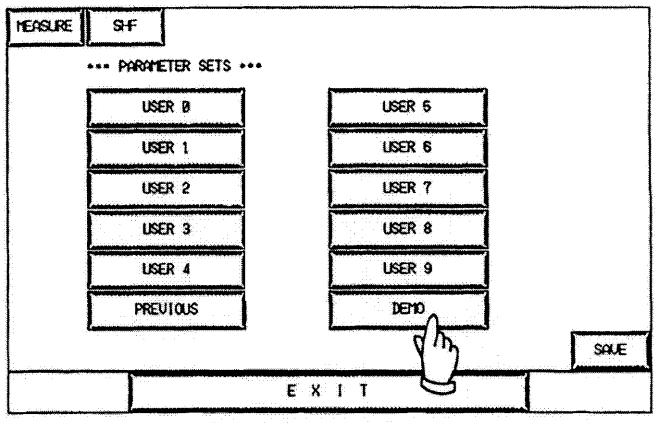
パラメータを選択する．

１．セルフチェック画面のOKを選択する．



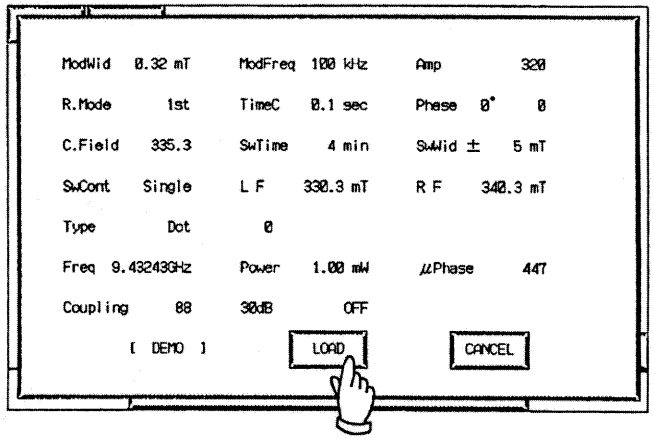
PARAMETER SETS画面が表示されます．

２．DEMOを選択する．



測定が表示されます.

３．LOADを選択して，測定条件を読み込む.

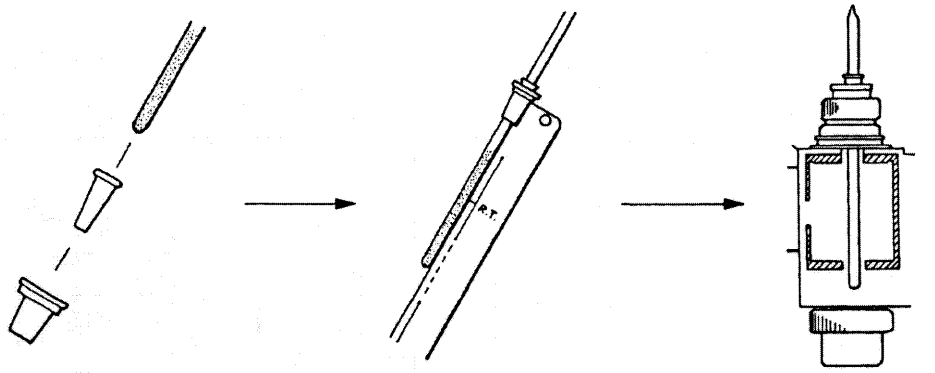


再びPARAMETER SET画面に戻ります.

試料を挿入する.

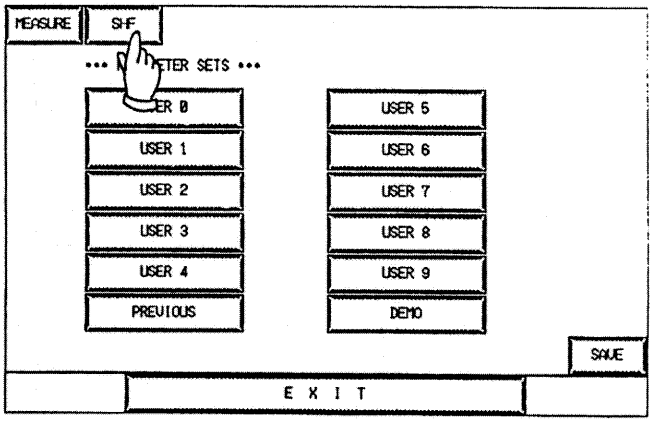
４．試料管についているゴミ，水分などをよく拭き取る.

５．下図の手順で試料管を空胴共振器に挿入する.



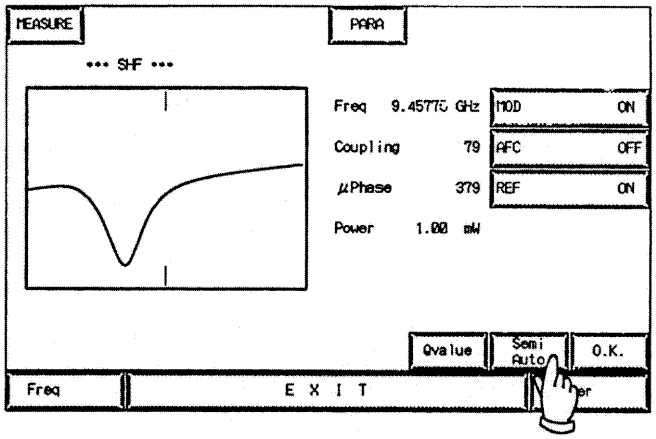
マイクロ波ユニット関係の調整をする.

６．PARAMETER SETS画面でSHFを選択する.

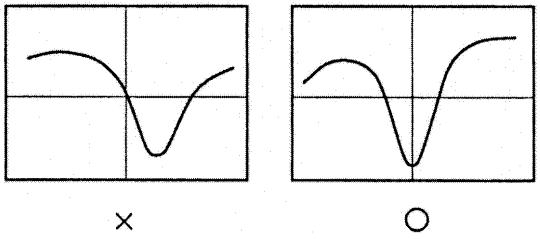


TEMPOLにあった測定条件が表示されます.

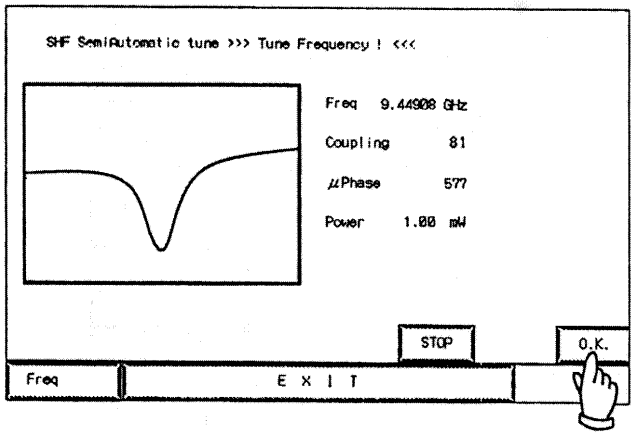
７．Semi-Autoを選択する.



８．左のジョイディスク(FREQ)を回して共振ディップが画面中央にくるようにする.



９．調整が終了したらOKを選択する.



１０．結合度を調整する.

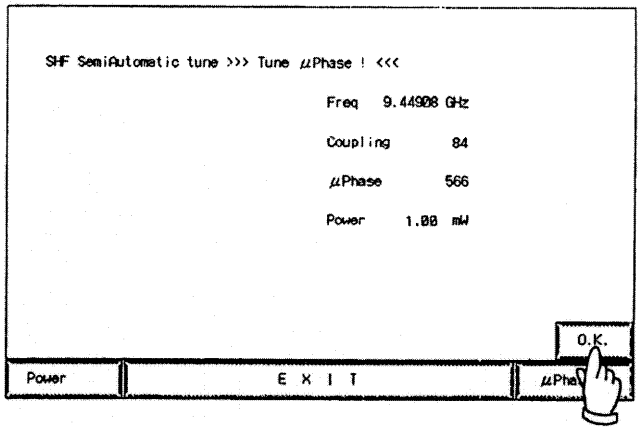
① 分光計右上のDET CURRENTインジケータを見ながら，ジョイディスク(POWER)でパワーを上げていき(TEMPOLの場合は約１～１０mW)※，DETCURRENTインジケータが点灯したら止める.

※最大出力は200mWですが，測定に必要な出力まで入力し調整すれば，通常必要なスペクトルが得られます.

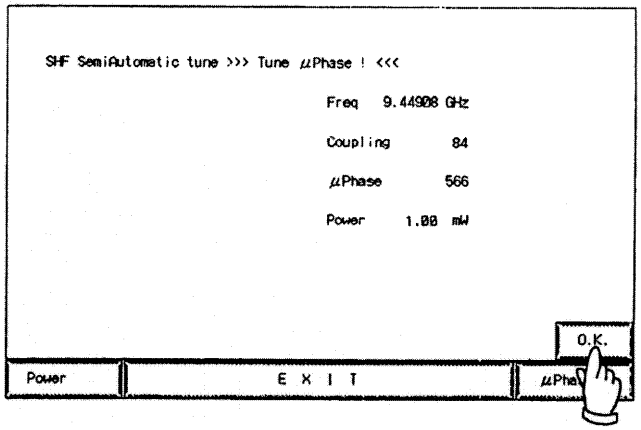
② ジョイディスク(Couping)を回し，分光計右上のDET CURRENTインジケータの表示が消えるようにする.

１１．POWERを1mWに戻す.

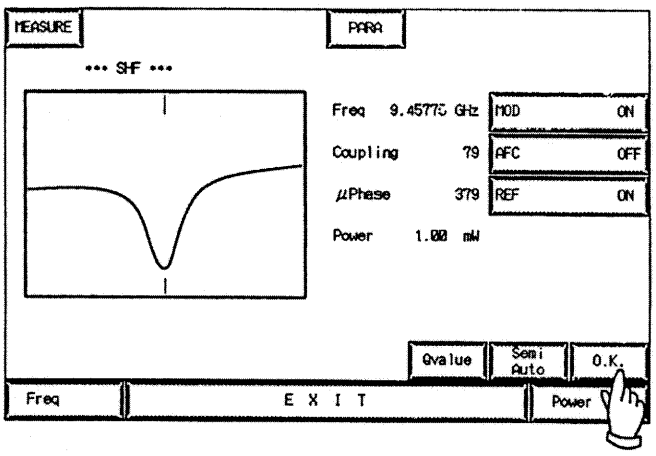
１２．OKを選択する.



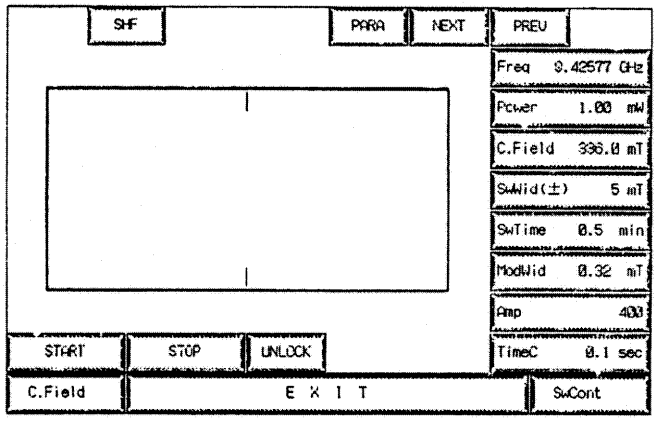
１３．分光計左上のAFC PHASEインジケータを見ながら，ジョイディスク(PHASE)を回し，AFC PHASEインジケータの表示が最小になるようにする．調整が終了したら，OKを選択する.



１４．OKを選択する.

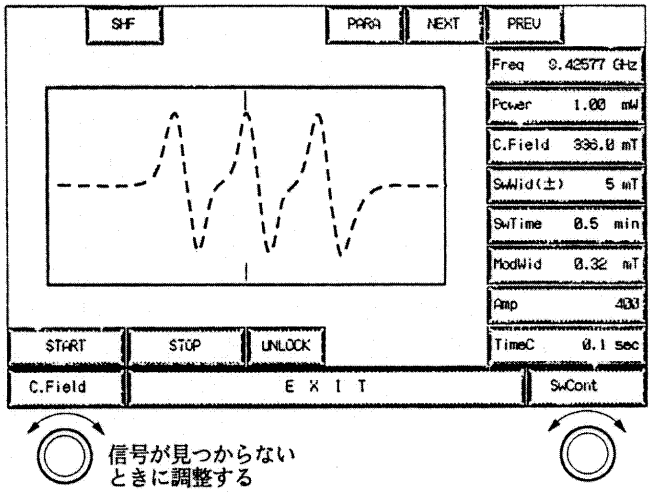


次の画面が表示されます.



信号を確認する.

１５．右のジョイディスク(SwCont)を回して，画面上で信号を確認する.
信号が画面の中央にない場合や信号が画面上にない場合は，左のジョイディスク(C.Field)を回して信号を探します.



レコーダの調整をする.

１６．チャート紙をセットして，CHARTスイッチをHOLDにする.

１７．PENスイッチをDOWNにする.

１８．X，YをSHORTにする.

１９．レコーダペンがX軸，Y軸ともに中心なるようにX，YのZEROつまみで調整する.

２０．X，YをMEASUREする.

信号をレコーダに記録する.

２１．SwTIMEを選択し，８minにする.

２２．STARTを選択する.

測定が始まり，チャート紙に信号が記録されます.

測定例（TEMPOL 1×10^{-6}molℓ／ℓ）

異なる試料を測定する場合は，２へ戻り，希望の測定条件を選択します．

４．２．３　装置を停止する．

測定は終了しているものとします．

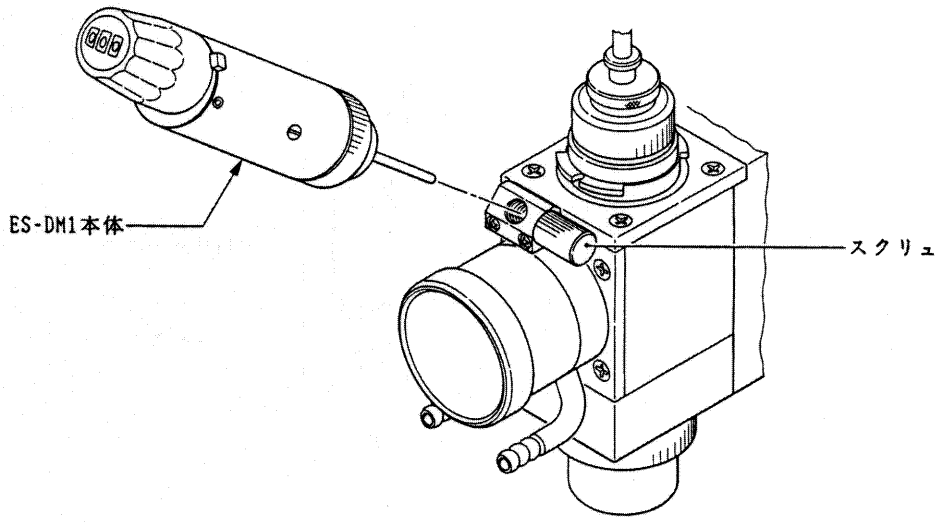
１．測定終了時で，マイクロ波のPOWERを０mWにする．
２．EXITを選択する．
３．分光計のPOWERスイッチをOFFにする．
４．冷却水を止める．
５．配電盤のスイッチをOFFにする．

§５　ESRマーカを用いたg値の測定方法

ｇ値の測定は，マイクロ周波数カウンタと磁場測定器を用いて算出する方法以外にESRマーカを利用して次のように簡単に測定することができます．

本装置にはデジタルマーカが備え付けられています．まずマーカの操作法について説明します．

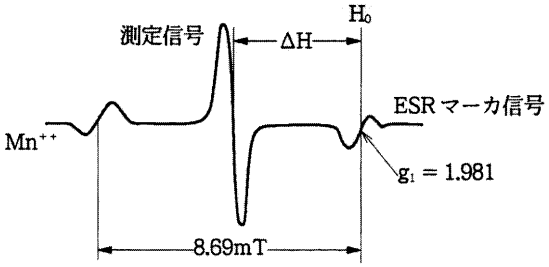
マーカ本体についているデジタル表示付きのダイヤルを回すことにより，標準サンプルマーカ（Mn^{2+}）が直進移動します．ダイヤルの目盛りは「500」で標準サンプルマーカがキャビティの空洞共振の壁面にセットされ，「999」で空胴部へ12mm移動します．（目盛「1」で0.03mm移動します．）



ESRマーカに使用されているMgO中に含まれる，Mn^{2+}の微細分裂である６本のESRスペクトルを示す．低磁場側から数えて３本目と４本目のｇ値はg_3=2.034とg_4=1.981で共振周波数 9200 MHz～9400 MHz の間では変化しません．この間隔は8.69±0.01mTです．

計算方法

測定試料とESRマーカの信号を同時に記録し下図のようなスペクトルが得られたとします．



測定試料のスペクトルと４本目のスペクトル管の間隔ΔＨは比例計算から求まります．ΔＨを求めると測定試料のｇ値は次のようにして求められます．

$$h\nu = g_4 \beta H_0$$

$$h\nu = g\ \beta(H_0 - \Delta H)$$

$$\therefore g = \frac{h\nu}{\beta(H_0 - \Delta H)} = \frac{\dfrac{h\nu}{\beta}}{\dfrac{h\nu}{g_4\beta} - \Delta H}$$

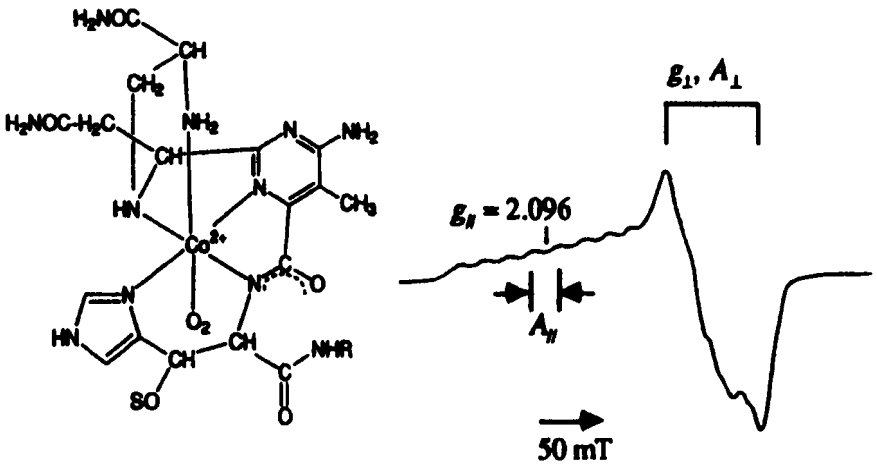
g_4=1.981，周波数νとして 9200 MHz～9400 MHzの中心周波数9300MHzを代入して計算すると，

$$g = \frac{655.1}{335.7 - \Delta H}$$

ΔＨがあまり大きくないときは，周波数が変化しても上式で求めたg値は３桁まで正しい値になります．従って，マイクロ波の周波数を測定することなく簡単にg値が求められます．ここで測定試料のスペクトルが４本目のスペクトルより高磁場に出た場合は，ΔHの値を負にします.

§６　応用研究

ESRの測定例を示します．コバルト(II)-ブレオマシン酸素錯体の凍結溶液のESRスペクトルを下に示します．コバルトの核スピン(I=7/2)に基ずく８本の超微細分裂が観測されている．このスペクトルから見積もられるg値とA値からCo2+イオン上の不対電子スピンは酸素分子上に移動していることがわかります.



Ｓ＝糖鎖
Ｒ＝ＤＮＡ認識部位

フーリエ変換赤外分光光度計
（日本電子 JIR-6500W ）

機器分析センター　田中栄緒；内線 4809

§１　はじめに

分子中の原子は，常に相互間で相対的位置が変動している．これが分子振動 molecular vibration である．この分子振動を調べる１つの方法として赤外吸収（赤外）スペクトル Infrared Spectrum（IR）法があり，物質に赤外線（通常，波長2.5～25μm，波数4000～400 cm^{-1}）を照射すると，その物質の分子振動に特有の振動数の赤外線が吸収され，その吸収位置より振動数を知る方法で，分子構造や分子の置かれている環境などに関する情報が得られる．

フーリエ変換赤外分光光度計 Fourier Transform Infrared Spectrometer（FT-IR）は，従来から使用されている分散型赤外分光装置に比べると，測定時間が短く，感度，精度ともに優れた性能をもっていて，微量の試料や低透過率の試料の測定に特に有利である．

§２　原理

赤外スペクトルを測定する１つの方法は光の干渉を利用することである．この方法は同時に全波長を測定し，また光量利用率が大きいという原理的特長を有している．

この方法の原理はマイケルソン干渉計によりインターフェログラムを測定し，フーリエ変換して赤外スペクトルを得ようというもので，その光学系の概略を図１に示す．

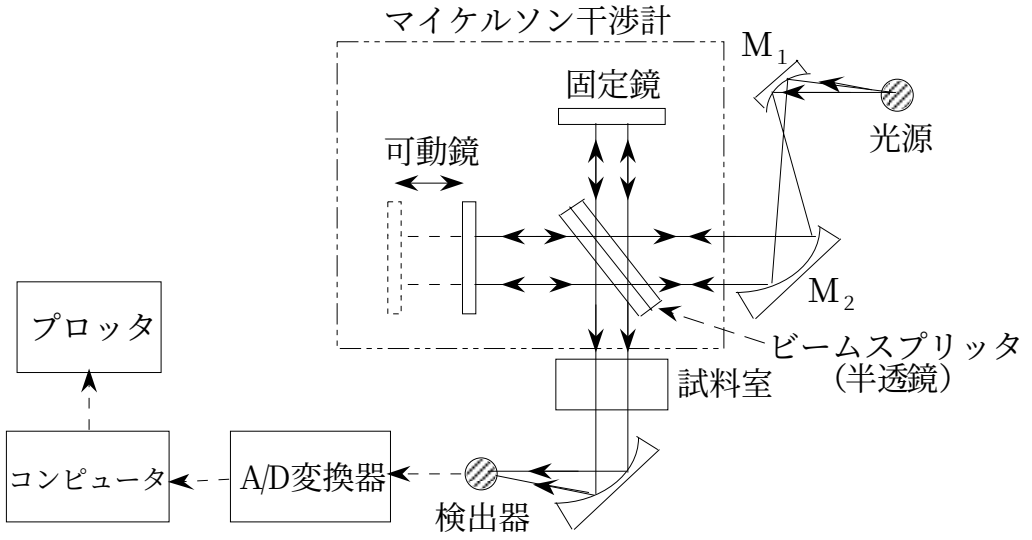


図１　FT-IR 分光光度計の構成

光源より出た赤外光は鏡 M_1，M_2 により平行光線になって干渉計に入り，ビームスプリッタ（半透鏡）により２方向に分けられ，一方は固定鏡により，他方は移動鏡により反射される．再びビームスプリッタ上で出会い干渉する．測定中には可動鏡は反復運動しているため，半透鏡に対して固定鏡との間に光路差が生じるので，赤外光は光路差を関数とする干渉光（インターフェログラム）となる．この干渉光は再び２方向に分離され，一方は光源方向に戻り，他方は試料に入射し，特定の光が吸収され，検出器に入り電気信号に変わる．電気信号はコンピュータでフーリエ変換によりスペクトルに変換される．このスペクトルとバックグラウンドスペクトルとの比を計算することにより，通常の赤外吸収スペクトルが得られる．

§３　測定方法

一般的にはどのような状態（固体・液体・気体）のものでも赤外吸収スペクトルを測定することができるが，現在機器分析センターにある装置では固体と液体の測定ができ，以下の測定方法がある．

１）透過法（臭化カリウム錠剤法・溶液法）
２）拡散反射法
３）全反射法（Attenuated Total Reflection：ATR）
４）顕微赤外法
５）試料温度可変顕微赤外法（Differential Scanning Calorimeter：DSC 分析）

３.１　透過法（KBr 錠剤法・溶液法）

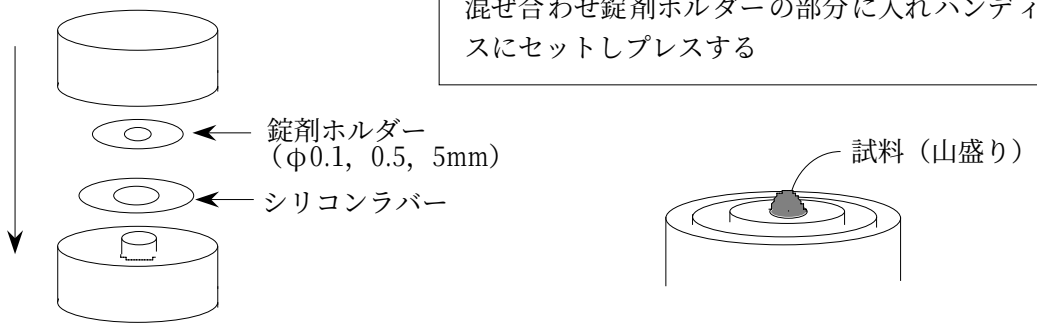
KBr 錠剤法は試料と KBr の微粉末を均質に混合し，プレスして透明な錠剤を作って　測定する方法で，固体粉末や結晶によく用いられる．

溶液法は液体および固体の試料を溶媒に溶かして測定する方法で固定セルに入れて測定する方法である．

＜試料調整＞

・KBr 錠剤法

試料とKBr（試料濃度1～2％）をメノー乳鉢に入れ混ぜ合わせ錠剤ホルダーの部分に入れハンディプレスにセットしプレスする



＜測定操作＞

【始動】

① データ処理部の電源スイッチを ON にする.

② 電源スイッチ横のスキャンランプが点灯した後, SF フロッピーをドライブ１に入れシステムをリセットする.
（異常がなければCRT 画面にJX+16 のタイトルが表示される.）

【測定準備】

① 操作モードを選択する. **F1： I-メニュー**

② 測定またはデータ処理の選択をする. **F1：測定**

③ モニタコマンドを指示する. **F5：モニタ**

④ インターフェログラムの形状を確認して，ダミー設定コマンドを実行し，ダミーポイントを設定する. **F1：ダミー設定**

⑤ 戻りコマンドを指示して測定パターンに戻る. **F0：戻り**

【測定】

① 試料室のシャッタを閉じ，パージをしながらバックグラウンド（BG）試料（KBr 錠剤法の場合：KBr のみの錠剤）をホルダーに入れてセットする.

② パラメータコマンドを指示する. **F7：パラメータ**

③ サンプル名，サンプル番号，分解能（通常4 cm^{-1}），スキャン回数（32回），検出器（STD)，テスト測定の有無（行う・１回）などの測定条件を設定する.

④ 戻りコマンドで測定パターンに戻る. **F0：戻り**

⑤ シャッタを開け BG 測定コマンドを指示するとテスト測定が実行される.
F3：BG 測定
（スペクトルが表示されないとき：スペクトル表示コマンドを表示し，Y オート表示コマンドを指示する. 戻りコマンドを指示し測定パターンに戻る）
F9：スペクトル表示／F6：Y オート表示／F0：戻り

⑥ 水蒸気の状態が変化しないようならパージを止めて測定コマンドを指示すると積算が実行される. **F1：測定**

⑦ ‘ 測定が終了しました ’ と CRT 上に表示されたら，シャッタを閉じ，パージをして BG を取り出し試料と交換する.

⑧ 戻りコマンドで測定パターンに戻る. **F0：戻り**

⑨ パラメータコマンドを指示しサンプル名を入れる. **F7：パラメータ**

⑩ 戻りコマンドで測定パターンに戻る. **F0：戻り**

⑪ シャッタを開け サンプル 測定コマンドを指示するとテスト測定が実行される.
F1：サンプル測定

⑫ 水蒸気の状態が変化しないようならパージを止めて測定コマンドを指示すると積算が実行される. **F1：測定**

⑬ ‘ 測定が終了しました ’ と CRT 上に表示される.

【データ処理】

① スペクトル表示コマンドを指示する．**F8：スペクトル表示**
② セットコマンドを指示する．**F8：セット**
③ 左端，右端，上端，下端コマンドを指示し，それぞれ適切な値を入力し，設定コマンドを指示する．**F1：設定**
④ 戻りコマンドで DT メニューパターンに戻る．**F0：戻り**（2回）
⑤ スポットコマンドを指示し，ピークを探す．**F1：スポット**
⑥ ピーク検出コマンドを指示する．**F9：ピーク検出**
⑦ スレッショルドコマンドを指示し，これから取るスペクトルのベースライン（紫色の線）を↑↓キーで設定する．**F3：スレッショルド**
⑧ ノイズコマンドを指示し，↑↓キーでノイズレベル（黄色の線）を設定する．**F4：ノイズレベル**
⑨ ピーク検出コマンドを指示する．（自動的にピークを検出）**F1：ピーク検出**
⑩ 戻りコマンドで DT メニューパターンに戻る．**F0：戻り**
⑪ プロットコマンドを指示し，プリントする．**F2：プロット**
⑫ パラメータコマンドを指示し，パラメータを設定する．
F6：パラメータ設定（変更するときは最後まで return キーを押す．）
⑬ プロッタに紙（A4 コピー用紙）をセットし，紙送りコマンドを指示する．
F8：紙送り
⑭ プロッタにペンをセットする．（通常，1：黒，2：赤，3：青，4：緑）
⑮ A4プロットコマンドを指示する．**F1：A4プロット**

【終了】

① 戻りコマンドで最初の画面（JX+16が表示された）まで戻る．**F：0戻り**（3回）
② 停止コマンドを指示する．**F0：停止**
② ‘ ソフトウェア・システムを終了してよろしいですか ’ と CRT 画面に表示されるので，‘ Y ’ と入れてreturn キーを押す．
③ CRT 画面に ‘ FT-IR システムを停止して下さい ’ と表示されるので，フロッピーを取り出しデータ処理部の電源スイッチを OFF にする．

3.2　拡散反射法

拡散反射法は粉体試料をそのままあるいは KBr の粉末に希釈するだけで手軽に測定でき，粉体や粗面を持つ試料（紙，ガラス，繊維など）のバルク分析や粉体に吸着した物質の確認などに用いられる．拡散反射とは図２に示すように入射した光が粉末の表面で反射および屈折し，反射光と透過光がさらに他の粉末により反射と屈折をくり返し，結果としてあらゆる方向に光が拡散する現象をいう．

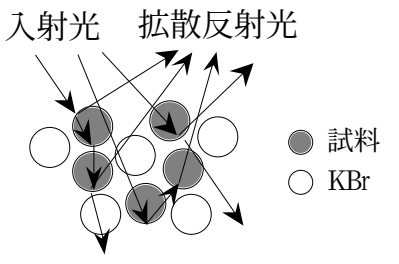
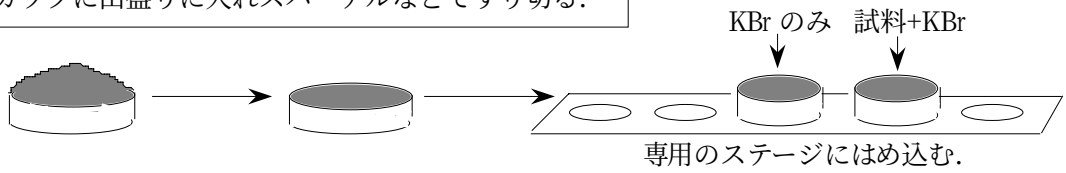


図２　拡散反射現象のモデル図

＜試料調整＞

試料と KBr （試料濃度：約10%）をメノー乳鉢で混ぜ合わせカップに山盛りに入れスパーテルなどですり切る.



＜測定操作＞

試料室に拡散反射用のアタッチメントを取り付ける．操作は３.１透過法に準ずる.

３.３　全反射法（ATR 法）

ATR 法は反射法の一種で，高分子膜，塗膜，紙，糸など透過法では測定が困難なものや表面分析，深さ方向の分析などに用いられ，試料を適当な大きさに切って，ATR 結晶に密着させるだけでスペクトルを得ることができるので，試料に化学的，物理的処理を加えることなく測定できる利点がある.

ATR 法は反射面として空気―試料面の代わりに，試料とそれより屈折率の大きい赤外線領域に透明な媒質（ATR 結晶板）を用い，媒質―試料界面で全反射が起こるようにすると，光は界面で反射するのではなく，ある深さだけ試料側にもぐり込んでから全反射する.

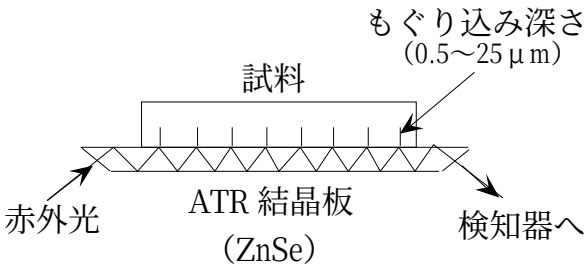


図３　ATR法の原理

この時試料に吸収のない波数領域では光は全反射するが，吸収のある領域では吸収の強さに応じて全反射光の強度が落ちる．この反射エネルギーを測定すれば，透過スペクトルに類似した全反射スペクトルが得られる.

＜試料調整＞

図３に示すように ZnSe の結晶板の上に測定したい表面側をできるだけ密着させる.

＜測定操作＞

試料室に ATR 用のアタッチメントを取り付ける．操作は３.１透過法に準ずる.

３.４　赤外顕微法

赤外顕微法は微小試料・局所分析（フィルム中の異物，層状フィルムの各層など）に用いる．また粉末結晶で化学的，物理的処理を加えることなく測定したい場合などにも用いることができる.

＜試料調整・測定操作＞　取扱い説明書を参照

３.５　試料温度可変赤外顕微法

試料温度可変赤外顕微法は試料加熱ステージを用い試料を昇温または降温（室温～375℃）させ物質の温度変化に伴う物理的．化学的変化をスペクトルを連続的に取り込んで追跡する方法である．微量試料で測定でき KBr などのマトリクスを必要としないため，試料からの純粋な情報が得られるというメリットがある．

＜試料調整・測定操作＞　取扱い説明書を参照

§４　仕様

＜基本性能＞

■波数精度	±0.01 cm^{-1} 以下	
■スペクトル分解能	0.5 cm^{-1}（最高分解能）	
■スペクトル感度	代表値4000：1（標準波数領域の分光器，4秒走査，	
雑音比（100%ライン）	1.6 mm/s 鏡移動走査速度，4 cm^{-1} 分解能，2000 cm^{-1} 波数領域における P-P 値）	
■迷光	0.01 %以下	
■サンプリング間隔	λ，λ/2	
■スペクトル波数		
波数領域	4,000～400 cm^{-1}	10,000以上～2,000以下
光源	セラミックス光源	ハロゲン光源
ビームスプリッタ	Ge 蒸着 KBr	Si 蒸着ガラス
検知器	DLATGS（CsI窓）	DLATGS（CsI窓）
■干渉計	15°入射マイケルソン形干渉計	
■測光方式	シングルビーム	
■オペレーション部		
ホストコンピュータ	32 bit CPU	
CRT	8色カラー，14インチ画面	
デジタルプロッタ	4色ペン，記録紙 A 4，オートフィーダ付	
■データ処理部		
AD 変換器	16+5 bit（自己判定形アップゲインコントローラ付）	
コンピュータ	サンプリングプロセッサおよび演算プロセッサ使用	

§５　利用上の注意事項

① FT-IR の装置（干渉計）は湿気により破損するので部屋の湿度に注意する．
② 空気中の二酸化炭素，水蒸気と試料中の水分は赤外吸収測定を妨害するので，試料室の開閉はなるべく少なく，試料は十分に乾燥し，試料調整は手早く行う．
③ 錠剤成型器などはアセトンなどでよく洗浄しておく．
④ 測定終了後，プロッタのペンは必ずキャップをしておく．

§６　応用例（試料温度可変顕微FT-IR）

【シリカゲルの表面水酸基と吸着水の温度依存性】

乾燥剤として用いられるシリカゲル粒子を細かく砕き，その小片（約100μm大）を試料として加熱によるOH基の吸収帯の変化を追跡した．試料片は厚さ1mm，5mmφのKCl結晶板の上に載せてホットステージにセットし，40℃から370℃まで昇温速度を10℃/minとして加熱し，顕微FT-IR測定条件を分解能8cm^{-1}スキャン回数32回，アパーチャ・サイズ50×50μmに設定して10℃ごとにIRスペクトルを取り込んだ．得られた全スペクトルをOH基の吸収帯のある2700～4000cm^{-1}の波数領域で重ね表示したチャートをFig.1に示す．加熱に伴って3200cm^{-1}中心としたブロードなピークが減少し，3740cm^{-1}付近のシャープなピークがはっきりしてくるのがわかる．
その変化の様子を定量的に見るために2700～3722cm^{-1}と3722～3757cm^{-1}の2つのピーク領域を選んでその面積強度を各スペクトルについて計算し，温度に対する強度変化を調べた．

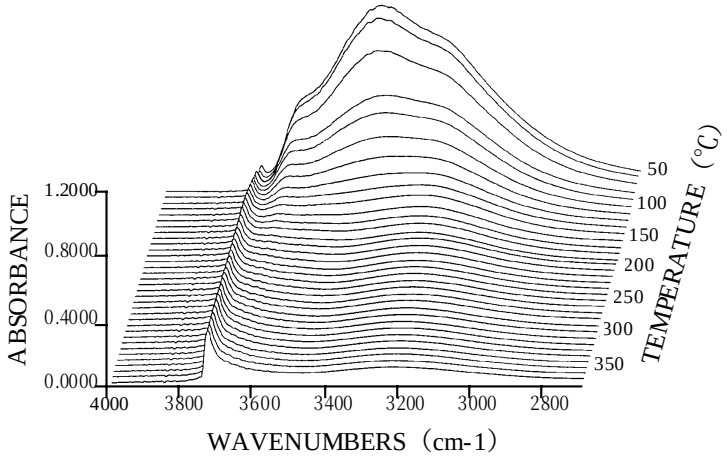


Fig.1　シリカゲルの加熱によるスペクトル変化

Fig.2に選択したピーク領域を，Fig.3にその強度を温度に対してプロットしたCMグラムを示す．

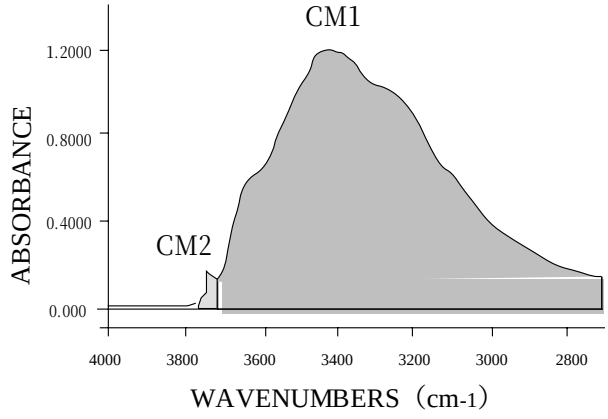


Fig. 2　強度計算に用いた２つのピーク領域

セクター型質量分析装置
(日本電子 DX-303HF,BU-20GC-mate)

機器分析センター　入口利之；内線 4832

§１　はじめに

有機化合物の構造を知るために、まず必要なことはその化合物の正確な分子量を求めることである。そのために現在ではマススペクトルを測定している。この場合、マススペクトルからは分子量だけではなく、その化合物の構造についての手掛かりとなる情報も得られる。質量分析計は微量（10^{-5}g程度）の試料で分子量を正確に求めることができ、１マスユニットごとに質量数に対応したピークが見られるので、特有の同位体存在比の原子（Cl、Br　や金属原子など）を含む化合物を容易に判別できる。また、分子量を小数点以下３～４桁まで測定すること（高分解能測定）により分子の組成決定にも用いることができる。マススペクトルは分子イオンピークだけでなく、その分子イオンが開裂してできたフラグメントイオンピークも見られるので構造解析の一助にもなる。
このようにマススペクトルは使い方によっては、さまざまな情報を与えてくれる測定法である。

§２　原理

質量分析装置は　イオン化部分と、本体とに大きくわけられ、それらの組み合わせによりいくつもの装置が考えられている。
イオン化法としては、EI、CI、FAB、FD、ESI、MALDIなどがあり、本体としては、TOF型、四重極型、磁場（セクター）型、FT-ICR型などがあるが、ここでは当分析センターに設置してあるDX-303HFおよびBU-20GC-mateに関することについて述べていくことにする。

１.イオン化法

ａ）EI　(electron ionization)　　電子イオン化

真空中（10^{-6}Torr　以下）で加熱気化させられた試料分子に熱電子が作用することによって、１個またはそれ以上の電子を放出しイオンとなる。
EI 法の特徴としては、試料を加熱気化させる必要があるため、難揮発性の物質や不安定な物質の測定が困難なことがあげられる。しかし測定方法が簡便なことやフラグメンテーションを起こしやすく多くの情報を得ることができるため最も多く使われている イオン化法である。分子イオンピークとしてはM^+, $(M+H)^+$,$(M-H)^+$などが見られる。

ｂ）CI　(chemical ionization)　　化学イオン化

EIにおいては電子が直接試料分子に作用してイオン化させるが、CIにおいては反応ガスに熱電子が作用することによって出来た反応イオンと試料分子とのイオン分子反応によってイオン化させる。この反応過程は他のソフトイオン化法（FAB,MALDIなど）の基礎となるものである。このイオン化の特徴はEIと同じく加熱気化を必要とするため、やはり難揮発性や不安定な物質の測定には向いていないということである。しかし、イオン化がソフトなためフラグメンテーションが起こりにくく分子イオンピークが確認しやすくなる。なお正イオン(PI)モードにおいては$(M+H)^+$が分子イオンピークとして観察される。

ｃ）FAB　(fast atom bombardment)　高速原子衝撃

マトリックスに溶解させた試料を高速中性原子（Ar,Xeなど）で衝撃することによる爆発的な気化と同時に起こる分子間衝突による解離性プロトン移動反応やイオン分子反応、衝突イオン化によりイオンを生成する。FAB法の特徴は適当なマトリックスを選択できれば低極性から高極性まで広範な試料を測定できるということがあげられる。また、負イオン(NI)が多く生成するのでPIモードとの比較により、分子量決定ができる。

なお、PIモードにおいては$(M+H)^+$、NIモードでは$(M-H)^-$が分子イオンピークとして観察される。

２.本体

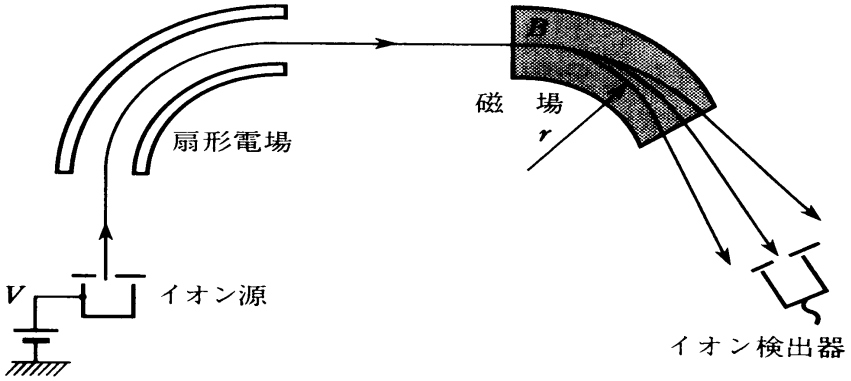
ａ）磁場型質量分析計

イオン化された粒子は加速され、ほぼ一定の速度を与えられたのちに、扇形の磁場を通ることによって進行方向が曲げられる。このとき各々の質量によって、曲がり方が違うことを利用して、各マスユニットに分離する。

ｂ）磁場型二重収束質量分析計

磁場型質量分析計に扇形電場を加えることによりイオンを収束させ、より高感度、高分解能な測定を可能にした装置である。

下にその摸式図を示す。



§３　仕様・性能

機種	日本電子製　JMS-DX303HF
	データ処理システム　JMS-DA5000
	イオン光学系　虚像型二重収束系(EB型)
分解能	25,000(10%Valley)
感度	0.05ng S／N≧10
質量範囲	m/z 1～6,900（加速電圧1kV）
	1～2,300（加速電圧3kV）
	（標準物質の関係で通常測定範囲は、
	EI,CI:50～800 FAB:50～2000）
使用可能イオン化法	EI,FAB

機種	日本電子製　JMS-BU20(GCmate)
	データ処理システム　DOS／V-PC(Windows3.1)
	イオン光学系　逆配置型二重収束系(QQQHQCQ型)
分解能	5,000(20%高)
感度	0.03ng S／N=10
質量範囲	m/z 1～1000 （加速電圧2.5kV）
使用可能イオン化法	EI,CI

§４　操作

基本的に装置の操作は担当者が行いますが、GCmateによるEI低分解能測定については、ルーチンで簡単にできるので以下に例として示します。

GCmate低分解能測定(EI)

０）各部の起動及びキャリブレーションは担当者が行います。

１）GCmateメニューウインドウの[Data Acquisition]をダブルクリックして、測定プログラムを起動させます。

２）「All samples in the file list have been conpleted.Clear the list ?」と聞いてくるので、[はい]をクリックします。

３）ファイル名を入力後[OK]をクリックします。

４）Sample Descriptionにサンプル名などを書き込みます。

５）MS Procedureのボックスをクリックし、出てきたファイルのなかから[lr.msm]を選び、[OK]をクリックします。

６）Deta File Descriptionウインドウの[OK]をクリックし、Active Filesウインドウを確認の後[OK]をクリックします。これで、測定プログラムの準備が終わりました。

７）ダイレクトプローブにサンプルチューブを取付け、チューブのなかに柄付き針などでサンプルを入れます。

８）ダイレクトプローブを本体にセットし本体内に導入します。

９）[Start]をクリックし測定を開始します。
１０）モニターを見ながら、適当なところで[■]をクリックして測定を終わらせ、プローブを抜きます。
１１）「Do you wish to re-analyze this sampl ?」と聞いてくるので、[いいえ]をクリックします。
１２）「Enter Data Reduction ? 」と聞いてくるので、[はい]をクリックして、データ処理に移ります。
１３）青いグラフでTICが表示されるので、適当なところをクリックするとスペクトルが表示されます。プリンタのアイコンをクリックすると、そのときアクティブになっているウインドウが印刷されます。

以上が、GCmateのおおまかな操作方法です。詳しくは担当者までお願いします。

§５　利用上の注意

１．１回の測定に使う量は、ごく微量ですがサンプリング等を円滑に進めるために１mg程度提出してください。
２．NMR測定後のサンプルを測定する場合には、d置換が起こっている場合があるので、乾燥後溶媒(d化溶媒でないもの)に溶かした後再び乾燥させたものを提出してください。
３．高分解能測定はピークの高さ、形などによって出来ない場合があります。
また、低分解能測定済みのサンプルについては、そのチャートを添付してもらえると有り難いです。

§６　応用例

FAB測定においては、様々なマトリックスだけでなく、そのマトリックスへの添加剤等も考えられている。
最も有名なのが、PIにおけるアルカリ金属塩(一般にNaIなど)添加による$(M+Na)^+$などの劇的な増加である。NaI添加前には全く見えていなかった分子イオンピークが、添加後はっきりと確認できるといったことがしばしば起きる。
酸を加えることによる$(M+H)^+$の増大をはかるといった方法もあるが、溶液をpH1程度にしないと結果が期待できないためあまり使用されない。
NIにおいては、ヘキサメチルホスホリックトリアミド(HMPA)などのプロトン受容体を添加することによって分子イオンピークが増大する。

参考文献

土屋正彦、大橋守、上野民夫編、「質量分析法の新展開」、現代化学・増刊１５、東京化学同人(1998)
上野民夫、平山和雄、原田健一編、「バイオロジカルマススペクトロメトリー」、現代化学・増刊３１、東京化学同人(1997)
中田尚男著、「有機マススペクトロメトリー入門」、講談社(1981)

付録

1.主なFAB用マトリックス

マトリックス名	適用性
グリセリン	標準マトリックス(PI,NI)
チオグリセリン	ペプチド(PI),有機金属化合物(NI)
マジックバレット	ペプチド(PI,NI)
2,2'-ジチオジエタノール	ペプチド誘導体,中極性化合物(PI)
ポリエチレングリコール(PEG)	オリゴ糖,マスマーカー(PI,NI)
ジエタノールアミン (DEA)	オリゴ糖(PI)
トリエタノールアミン (TEA)	オリゴ糖(PI),糖脂質,脂肪酸,スルホネート,グルクロニド(NI)
2-ヒドロキシエチルホルムアミド (HEF)	配糖体,オリゴ糖(PI)
α-ピロリドン(PR)	配糖体,オリゴ糖(PI)
テトラメチレンスルホン (スルホラン)	低極性化合物(PI)
2-ニトロフェニルオクチルエーテル (NPOE)	低極性化合物,有機金属化合物(PI)
3-ニトロベンジルアルコール (NBA)	低極性化合物,中極性化合物,有機金属化合物(PI)

2.主な元素の精密質量(天然存在比が最も大きいもの)

H	1.0078
C	12.0000
N	14.0031
O	15.9949
F	18.9984
Na	22.9898
Si	27.9769
P	30.9738
S	31.9721
Cl	34.9689
K	38.9637
Br	78.9184
I	126.9044

ガスクロマト質量分析計

(HEWLETT PACKARD HP5972型GC/MS)

薬学部　薬剤学研究室　末永綾香；内線 4153

§１　はじめに

成分分離に優れた能力をもつ，ガスクロマトグラフィー(GC)と，成分の構造に関する情報を与える質量分析(MS)を組み合わせたGC-MS分析法は，分離面と定性面で相補うべき関係にあり，極めてわずかの試料で，それぞれの情報を相乗的に利用できる優れた分析法である。GCとMSは，それぞれ独自に発展してきた分析法であるが，それぞれの新しい開発技術が取り入れられ，質量分析法の重要な分析手法の一つとして，ライフサイエンスの分野，複雑な生体構成成分，薬物代謝物，天然生理活性物質，環境成分などの構造解析や定量分析に不可欠な手法となっている。

GC-MS分析は，磁場型のMSを用いると，ほぼ大気圧でカラムから出てくる試料を10^{-6}mmHg程度の高真空のイオン化室に導入しなければならないので，キャリヤーガスを取り除くセパレーターが必要となる。一方，四重極型のMSを用いると，分析管の容積が非常に小さいため，セパレーターを用いず，GCからの溶出物を直接イオン化室に導入でき，最近，この種の小型のGC-MSが手軽に利用されている。

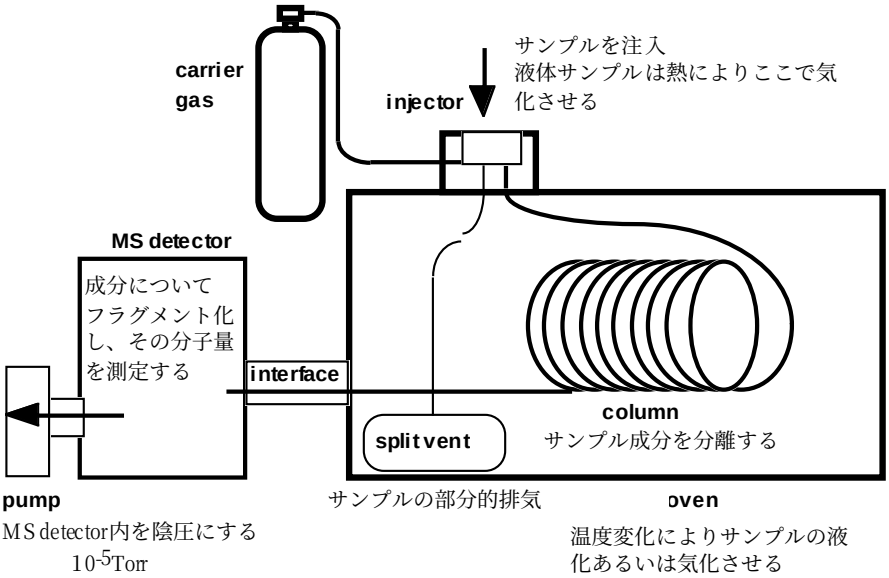
また，GC-MS分析法は，数十個の化合物を含む試料からそれぞれのマススペクトルを短時間に与えることができるので，スペクトル解析を迅速にするために，多くはデータ処理装置が装備され，マススペクトルデータファイルを利用すれば，含まれる化合物の構造の推測が容易にできる。

§２　原理

2.1　理論

(1)　Gas Chromatography(GC)とは

気相中において，吸着および分配の原理に基づいて，試料の気体，液体の分離分析を行う。分離用の固定相として沸点の高い液体または固体を用い，これをシリカなどの表面に予め薄い層をつくるように吸着させたものを用いる。移動相として用いるキャリヤーガスは試料および固定相と反応しない不活性ガスとして一般的にヘリウムや窒素ガスが用いられる。



(2)　Mass Spectromertry (MS)とは

気体試料に適当なエネルギーの電子衝撃を加えると気体はイオン化され，そのうち陽イオンのみを取り出し，磁場によるイオンの方向収束を利用したものである。

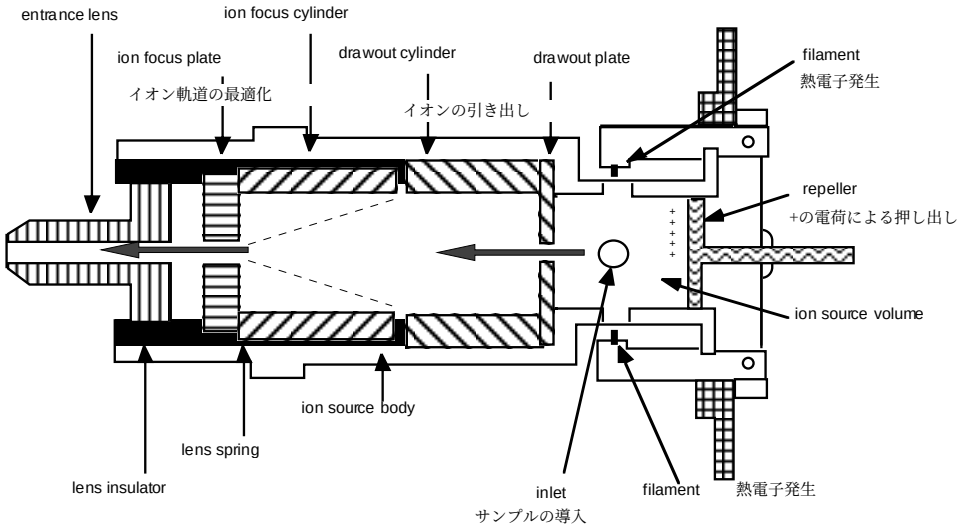
気体試料はガスだめに送られたのち，ガスリークを通ってイオン室に入る。ここで一定のエネルギーをもった電子の衝撃を受けると，気体分子は電子を失って陽イオンとなる。このようにして生じた陽イオンは電極間にかけられたイオン加速電圧によって加速され，イオン源を出て，磁場に入る。ここで磁場の作用を受け，質量に応じた軌道を描くが，これをさらにコレクターに受け，記録される。

質量分析の基本となる式は

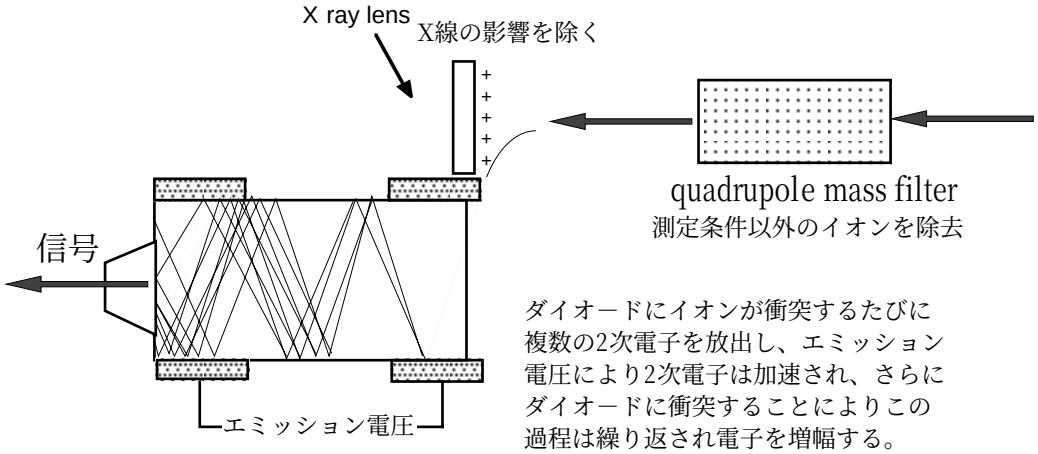
$$\frac{m}{e}=4.82 \times 10^{-5}\frac{r^2B^2}{V}$$

ここで磁束密度をB，イオン加速電圧をV，荷電数をe，イオンが垂直な面の磁場の作用を受けて，その遠心力により描く円軌道の半径をr，原子質量単位をmとする。

イオン源の構造（イオンを作り一定方向に加速させる）



検出器（分離したイオンを電気信号に変換）



2.2　方法

（1）　装置の起動

1. GC注入口（インサート，O-リング，セプタム等）の確認
2. カラムを取り付けます。
3. キャリヤーガスを流します。（ＧＣの後ろにあるヘリウムガスを流す。）
4. GC, MSD, ALSの電源をONにする。
5. ワークステーション関係についてONにする。
   1. WINとタイプするとWindowsが起動します。
   2. プログラムマネーシャをダブルクリックしてください。
   3. GCのアイコンをダブルクリックしてください。
   4. MS-Topのアイコンをダブルクリックしてください。

6. チューニングを行います。
   1. チューニングMSの診断/真空制御を選択してください。
   2. 真空制御の真空排気を選択してください。真空排気が始まります。
   3. ここでMSの電源が入っているかどうか確認のメッセージがでます。（電源が入っている場合はOK）
   4. 真空排気の状況について表示します。DPクールからDPホットにかわるのを待ちます。（圧が300mtorr以下になるとDPヒーターがONになります。
   5. 『transfer lineとGC ovenのヒーターをONにしてください。』のメッセージがでます。ここでGCのキーボードで任意の温度に設定してください。目安として Detector B. temp. : 280℃，oven: 使用温度

   （注意）Detector B. temp. は通常250-320℃の範囲で使用しますが，使用するカラムの最高使用温度を越えないようにしてください。
   6. ここで4時間程度待つようにメッセージが表示されますので待ちましょう。

（2）　装置の停止

1. チューニングMSの診断/真空制御を選択します。
2. 真空制御のベントサイクルを選択します。
3. トランスファーラインのヒーターをoffに，そしてGCのオーブンの温度を室温にさげるようにメッセージが表示されますので，指示に従いOKをクリックしてください。
（この時GCのキーボードで温度設定。Detector B.temp. : off, oven temp.: off or 室温, injector temp: off)
4. ベントサイクルの状況について表示されます。ベントサイクルが終了するのを待ちましょう。
5. 『ベントサイクル終了。MSの電源をoffにしてください。』のメッセージが表示されますのでDPポンプ後部が熱くないことを確認後，MSD, GCの電源をoffにしてください。
6. MSケミステーションを終了してください。（チューニングMSの終了を選択してください。）
7. Windowsを終了してください。（fileの終了を選択）
8. ここでWindowsを終了しますか？とメッセージが表示されますので，OKをクリックしてください。
9. コンピューター関連の機器の電源をoffにしてください。

（3）　チューニング

目的：イオン源各部の電圧調整，分解能の調整，感度の調整，マス軸の校正

1. TuneMSのStandard Spectra Autotuneを選択してください。
2. 自動的に標準物質を用いてチューニングします。
3. 結果についてプリントアウトされます。（この結果はGC-MSのメンテナンス上，重要なデータなのでfileにして保存します。）
4. 結果についての考察
    1. ピークの形状：左右対称。ノイズが目立たないこと。
    2. マス軸：それぞれ69，219，502±0.2
    3. PW(peak Width)：0.4〜0.6
    4. Rel Abundance：マス69…100%，マス219…35%以上，マス502…1%以上（基準値に達しない場合はイオン源が汚れています。薬剤学研究室へ届け出てください。）
    5. マス18，28，32のピークが大きい場合：Air Leakが考えられます。セプタム，カラムの接続について確認してください。また，長期間使用しない場合，MS部に水が混入していることがあります。そのときは水が排気されるのを待ちましょう。使用可能となるためには，これらのピークが10%以下になる必要があります。

（4）　メソッドの作製

目的：GC及びMSDの測定条件について編集する。

1. MethodのEdit Entire Methodを選択し，画面に表示されるすべての項目についてチェックし，OKをクリック。
2. 作製するメソッドについてのメモをMethod Commentに書き込みましょう。
3. Data Acquisition, Data Analysisの項目にチェックし，OKをクッリク。
4.接続GCを選択します。HP5972の項をチェックしましょう。
5. チューニングファイル（チューニングの結果が記録されているファイル）を選択。通常，ATUNE. Uのままでよい）OKをクリック。
6. 測定モードを選択します。定性について検討する場合，Scanを，定量の際はSIMを選択してください。ここではまずScanについて以下説明していきます。
7. Scan条件の設定

Solvent Delay.....注入後溶媒ピークがで終わるまでMSDの電源をoffにします。
必ず設定してください。フィラメントが劣化します。

EM Voltage.....通常，Relを選択し，0を入力。

MS Scan Parameter

MS Range...取り込みを行う質量範囲

Start Time...各時間に取り込みを行う質量範囲を変更したいとき設定

Threshold...入力した値以下のピークを除外する（100～200くらいに設定）

Sampling...2^x回数信号読みとり（高いほど分解能が上がり，低いほど感度がよくなる。）次のScan/sec参照

Scan/sec...1秒あたりのスキャン回数（この値が約2前後になるよう
Samplingの値を調節してください）

Plot#1,2...設定しません（特定のイオンをモニターしたいとき設定。）

Real Time Plot Parameter

Time Window...モニター画面のクロマトの時間軸

Ion Plot Type...Plot#1,2それぞれTotal, Noneを設定してください。

8. オンカラム注入口の温度設定

通常，オンカラムは使わないので，ここでは用いている注入口(A or B)を選択してOKをクリックしてください。

9. 注入口の圧力プログラムの設定

Select Inlet.....注入口を選択

Inlet A(B) Constant Flow.....チェックすると一定流速モードになる。

Inlet A(B) Pressure Program

Init. Pres...初期圧力

Initial Time...測定時間を設定

＊通常，圧力プログラムは組まないので上記の2項目のみ設定

GC Pressure Units...圧力単位（psiが一般的）

Entered Values..使用条件。カラムの長さ，内径，キャリヤ-ガスの種類について設定

Calculated Values.....圧力，流量，線速度などの計算を行う。
Split Mode Inlet Info.....スプリット分析の時のスプリットベントからの流量を入力してください。この値は石けん膜流量計で直接測定してください。詳しい測定方法は石けん膜流量計のマニュアルを参照してください。

10. Aux. Pressure Program....ないので設定しません。
11. GC温度の設定
Zone Temp.....使用するinjectorとDet.Bを選択し，温度を設定
Oven Parameter.....オーブンの温度
Oven Equib Time...初期温度に達した後の安定時間
Oven Max...カラムの最高使用温度を入力
Cryo On, Cryo Blast On...付属していないので選択しない

Oven Program.....オーブン温度のプログラムを入力
Init. Temp...初期温度
Init. Time...上記の温度での持続時間
Level 1,2,3....昇温プログラムが3段階設定できる（その結果がグラフに表示）

12. インジェクターの条件
Source.....Manual(手打ち), Auto(オートサンプラー)を選択
Location.....オートインジェクターの位置を設定(Front or Rear)
ALS.....オートインジェクターの条件設定
Sample Washes...サンプルの共洗い回数
Sample Pumps...エアー抜きのポンピング回数
Sample Volume...サンプル注入量（1/10毎に設定。10μlシリンジの場合は5 stepは5μlに相当する。
Viscosity Deley...プランジャーを引いて保持する時間（サンプルの粘度が大きい場合，長めに設定）
Solvent A(B) Washes...洗浄溶媒A(B)でのシリンジ洗浄回数
On-column...オンカラム使用時Yes.通常，No

Purge A/B.....注入口の排気についての設定
1. 使用している注入口(A or B)を選択
2. スプリットモードの場合.....On Time, Off Time共に0minと入力
スプリットレスの場合.....On Timeを任意の時間，Off Timeを0min

13. MS Run Tableの設定
分析中にMSDのOn/Off, EM Voltの上げ下げを設定する。もし，分析サンプル中に必

要のない大きなピークが出現する場合，そのピークが溶出する時間帯はMSDをoffにするよう設定してください。フィラメントの劣化の原因となります。

14. Select Report.....レポートの出力形式
    Percent Report...普通の様式
    Lib Search Report...定性の様式
    Quant Report...定量の様式
    Custom Report...MS Excelの様式

15. メッソドのsave
    作製したメッソドに8文字までの名前をつけて保存（ただし，=,.;:/[]等の文字は使用不可。アルファベットか数字を使用してください。）

（5）サンプルの測定

1. MethodのRunを選択します。
2. ここでData File Name(保存ファイル), Operator Name(あなたの名前), Sample Name(サンプル名), Misc info(その他の情報)について入力します。
3. Run Methodをクリックするとメッソドが実行され分析が開始します。
4. Solvent Delayについて設定を行った場合，その設定時間後からMSDがonとなり分析が開始されるのですが，ここで，『Solvent Delay Timeを無視しますか？』と表示されますので，ここではNOを選択してください。
5. 分析状況について表示されます。

（6）データ解析

各目的により様々なデータ解析が行えます。したがって，必要なデータ解析についてはマニュアルを参照してください

（7）シーケンスの設定

この項目は多くのサンプルを自動的に測定する際に使用します。したがって，ここでは省略します。

§３　装置の仕様・附属設備

(1) 仕様

機種 :GC ; HP5890シリーズII
: MS ; HP5972A (イオン源; EI, フィラメント; デュアルフィラメント, マスフィルター;クォーツ製一体型四重極，検出器；エレクトロンマルチプライヤー)
質量範囲 : 1.6～700, 0.1μステップ
分解能 : ユニット分解能
感度 : 100pg メチルステアレートでS/N > 40

スキャンスピード: 1800amu/秒
SIMチャネル数 : 30イオン, 50グループ
ダイナミックレンジ : 6.5 X 10^6

(2) 付属設備
パソコン: HP486/66 XM.Vectra
オートサンプラ: 100検体用

§４　利用上の注意事項

① GCの測定条件は，あらかじめ別のGCを用いて検討してください。
② キャピラリーカラムや消耗部品は，原則として使用教室毎に各自準備してください。
③ 使用後は，備え付けの使用記録簿に必要事項を必ず記入してください。
④ 機器のメンテナンスを行う場合，薬剤学研究室(tel : 371-4153)に連絡してください。

§５　応用例

最近の質量分析法がもつ優れた性能を医療や医学研究に応用する試みが早くから行われてきた。そのような応用例の一つに，代謝異常症の化学診断がある。ここでは，有機酸代謝異常症の一つである，プロピオン酸血症のGC/MS/COMによる分析例の概要を紹介する。

臨床症状として，発育遅延や知能障害のみられるプロピオン酸血症では，尿中有機酸の代謝プロファイルは，中間体として生成した細胞毒性の強いプロピオニルCoA処理のための色々な反応生成物である異常代謝物の出現により，一様ではない。しかし，本疾患では病態の如何を問わず，メチルクエン酸，3-ヒドロキシプロピオン酸，2-メチル-3-ケト吉草酸などの異常代謝成分をGC/MSの代謝プロファイルから検出することによって，確実にプロピオン酸血症を診断できる。

§６　おわりに

機能的なクロマトグラフィー/MS複合システムの登場により，ライフサイエンスの分野のみならず，広範な分野の研究への寄与を期待したい。

参考文献

1）土井正彦　等編　「質量分析法の新展開」（東京化学同人，1989）
2）泉美治　等監修「機器分析のてびき（増補改訂版）」（化学同人，1988）
3）立松晃　等編「GC-MSの医学・生化学への応用（化学増刊88）」（化学同人，1980）

液体クロマトグラフ直結質量分析装置
（HITACHI M-1200形 LC/MS）

大学院薬学研究科　病態・生体情報学講座　入江徹美；内線 4168

§１　はじめに

液体クロマトグラフ直結質量分析計 (LC/MS) は、LC 単独では分離困難な成分を高感度・高選択的に分離定量し、未知成分の分子量や構造情報（定性情報）をリアルタイムで取得できる装置である。[1)] LC/MS の出現により、ガスクロマトグラフ直結質量分析計 (GC/MS) では分離分析が困難であった多くの不揮発性化合物の測定が可能となった。さらに最近、LC と MS を結び付けるインターフェイスとして大気圧下で試料を霧化、イオン化するソフトイオン化法が開発され、その応用範囲は急速に拡大しつつある。

大気圧イオン化法には、エレクトロスプレイイオン化法 (Electrospray Ionization, ESI) と大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Chemical Ionization, APCI) がある。ESI 法はイオン性化合物、高極性化合物、ペプチド類や分子量数万以上の蛋白質類など高分子化合物を高感度にイオン化できる。一方、APCI 法はステロイド類や脂肪酸類など比較的低極性化合物から糖類などの極性化合物まで適用範囲の広さでは他の LC/MS インターフェースを凌駕するが、高極性化合物の測定は不得手である。このように、両イオン化法は互いに相補的な応用分野を持ち、同じく大気圧下でイオン化を行うので、相互切り替えが容易である。

§２　原理

2-1. ESI 法の原理

ESI 法は加熱や粒子衝撃／エネルギー照射といった分子レベルでの破壊操作を伴わないため、ペプチド・蛋白質類など生体高分子に有効な最もソフトなイオン化法の一つである。ESI 法では、溶液中のイオン種がその周囲の溶媒分子を振り解きながら真空中へ取り出されることでイオン化が起こる。

一般に、溶液中で溶媒和されている溶質分子は、溶媒と溶質との相対的なプロトン受容能、溶質の塩基性部位または酸性部位の数に応じて、正負イオン対を形成する。LC から供給されるキャピラリー内の試料溶液の電荷密度は均一であるが、キャピラリー先端またはその近傍に高電界を印加すると、イオン対は空間的に分離する (Fig. 1)。キャピラリー先端部で電荷分離が起こると、溶液中に正イオンに富む部分と負イオンに富む部分が生じ、電荷密度は不均一となる。電荷分離した溶液は、反対電荷の対抗電極へクーロン引力で引き寄せられ、さらに同軸方向への圧搾空気流によって破断霧化する。その際、温められた気体雰囲気により微小液滴表面から溶媒が蒸発し、その半径が Rayleigh

極限 (液滴状態を維持している表面張力による凝集力が、液滴中の過剰電荷によるクーロン反発力に等しくなる) に達すると、自発的なイオン種の蒸発や液滴の分裂が起こる。イオン種の蒸発は、Rayleigh 極限に達する前にも起こり、また極限半径より小さな液滴では表面張力は逆に液滴を押しつぶすように作用するので、イオン蒸発や分裂はさらに加速される。このように、ESI 法の原理は高電界による溶液の正負イオン分離と噴霧による自発的なイオン蒸発にある。

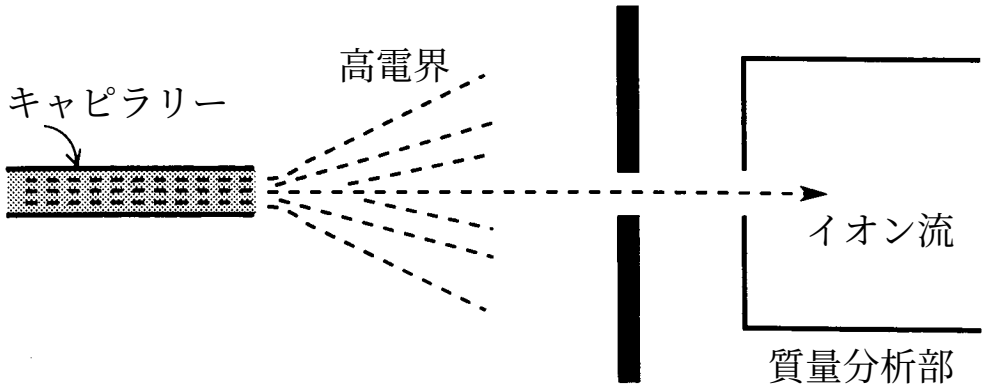


Fig. 1

2-2. APCI 法の原理

APCI 法では、加熱キャピラリー先端からの噴霧気化とコロナ放電用の高電圧電極先端でのイオン化が、別々に起こる (Fig. 2)。気化には高電界を用いない代わりに試料溶液の加熱噴霧を要するため、溶液中での熱分解が懸念される化合物に不向きである。その際、脱溶媒和による気化熱のため試料分子の熱分解は抑えられるが、ある程度の熱振

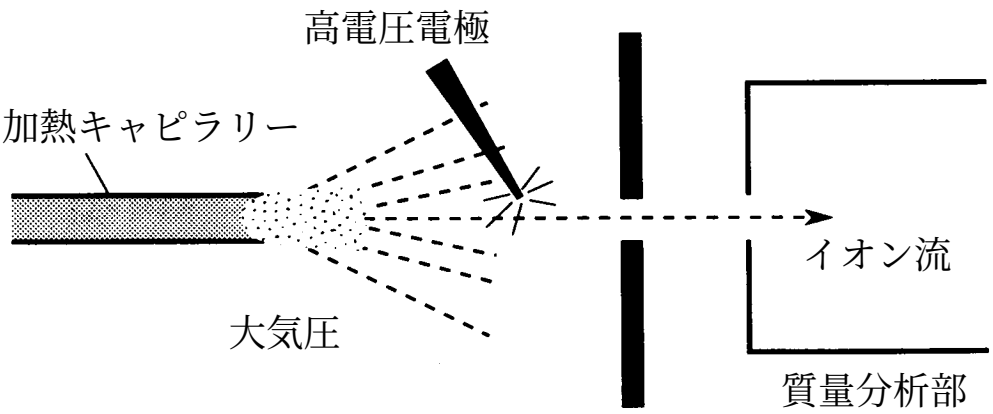


Fig. 2

動励起は避けられない。また、試料溶液はキャピラリー先端から噴霧されると同時に、さらなる微粒子化（脱溶媒）のために加熱ガス雰囲気中を通過するが、ESI 法のようなイオン蒸発や顕著な多価イオン生成は期待できない。APCI 法は、比較的低分子量 (~1000 Da) で低極性から中極性化合物の分析に適し、ESI 法に比べてフラグメント情報に富む。

§３　操作方法

M-1200H 形 LC/MS システムの操作方法を以下に概説する。

3-1. 起動前の確認項目

(1) 本体操作パネル
- EVAC スイッチが ON になっており、EVAC の READY ランプが点灯している。
- ターボ分子ポンプ (TMP) の PS と NORMAL が点灯している。ERROR ランプが点灯しているときは、RESET スイッチを押す。
- VACUUM ランプが 5 目盛点灯している (VACUUM が 5 未満の時はクリーニングする)。

(2) N_2 ガスボンベ
- 残圧が 5 kgf/cm^2 以上である (5 kgf/cm^2 未満の場合は交換してから使用すること）。
- ESI を使用する時は、N_2 ボンベの元栓を開き、ゲージの圧力が、3~5 kgf/cm^2 になるように調圧バルブを調整する。

3-2. 起動操作

(1) コンピュータのスイッチを ON にする。約 1 分で初期画面が表示される。
(2) 本体操作パネルのAPI、RF スイッチを ON にする。
(3) キーボードの Num Lock キーと Caps Lock キーを押す。
(4) HIT mass-LC/MS のアイコンをダブルクリックする。
※　30分ほどでイオン源の温度が安定する。
(5) ファイルを開き、測定条件を設定する。
(6) LC ポンプの流速を設定後、ポンプのスイッチを ON にする。
(7) N_2 GAS Controller のレバーを ON にし、Controller の圧力を 1.8 kgf/cm^2 に調整する (ESI モードのみ)。
(8) 設定温度まで上昇したことを確認後、コンピュータと本体を接続し、本体操作パネルの NEEDLE スイッチを ON にする。
(9) 試料を注入する。

3-3. 停止操作

(1) 本体操作パネルの NEEDLE スイッチを OFF にし、コンピュータと本体とのコネクトをはずす。
(2) 本体操作パネルの API、RF スイッチを OFF にする。

(3) 測定終了後から最低 15 分ほど移動相を流してから LC ポンプを止める (ESI モードの場合は N_2 GAS Controller のレバーを OFF にする)。
(4) マウスを右クリックし、続いて、Shut down をクリックする。
(5) 終了メッセージが表示されたら (Shut down has completed ~)、コンピュータのスイッチを OFF にする。
(6) N_2 ボンベの元栓を閉める。

3-4. クリーニング（通常、測定終了後行う）

(1) 確認事項
・LC ポンプの停止
・N_2 ボンベの元栓を開く (3~5 kgf/cm^2) 。
・N_2 GAS Controller を OFF にする
(2) EVAC スイッチを OFF にする。
※ 約 15 分で N_2 ガスパージ弁が開き、N_2 ガスパージが行われる (N_2 PURGE ランプが点灯)。約 15 分で N_2 ガスパージが完了し、自動的に N_2 ガスパージ弁が閉じる。AIR ランプが点灯し、VACUUM ランプがすべて点灯する。
(3) MS 本体側のインターフェイス、Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE を外す。
(4) Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE のクリーニング
・裏側のくぼみにメタノールを数滴たらし、ワイヤー (0.2) を通し、細孔内の汚れをこすり落とす。
・メタノールを含ませたガーゼで Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE の表と裏の両面を拭く。
(5) Aperture 2 のクリーニング（MS 本体に接続したまま）
・ メタノールを含ませたガーゼで表面を拭く。
・ ワイヤー (0.1) を通し、細孔内の汚れをこすり落とす。
(6) インターフェイス、Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE を取り付ける。
(7) EVAC スイッチを ON にする。
(8) WAIT ランプが消えたことを確認し (約 20 分後)、N_2 ボンベの元栓を閉める。

§ 4　装置の仕様・付属設備

M-1200H 形 LC/MS システムの仕様および付属設備を以下に示す。

(1) 仕様

LC 部機種	: HITACHI L-6200 形インテリジェントポンプ
MS 部機種	: HITACHI M-1200 形 LC/MS システム
測定範囲	: m/z 10~2000
ﾏｽﾏｰｶ精度	: m/z 10~800, ±0.3 amu
	m/z 801~1200, ±0.4 amu

(2) 付属設備

パソコン　　: HEWLETT PACKARD Vectra 486/33U
OS　　: IBM OS/2 Version 2.0
プリンタ　　: HEWLETT PACKARD レーザジェット III P プリンタ
外部記憶装置　: 日本ﾊﾟｰｿﾅﾙｺﾝﾋﾟｭｰﾀ JP3230E 光磁気ディスクサブシステム

§５　利用上の注意事項

① 疎水性や粘性が高い試料など配管につまりやすい試料を測定した後は必ずクリーニングを行い、既知のサンプル (PPG や PEG など) を用いて感度の確認を行う。
② 測定中 VACUUM メーターが 5 を示していても、思うような感度が得られない場合、測定を中断してクリーニングを行うと感度が回復することがある。
③ 水分が多い、あるいは不揮発性成分 (リン酸など) を含む移動相は使用しない (スクロールポンプの故障の原因となる)。
④ N_2 ガスの残量が少なくなった場合は直ちに測定を中断し、ガス交換を行う。
⑤ データがある程度増えてきたらハードの容量に限りがあるため、ハードの残りの容量を確認しながら、データは付属の光磁気ディスクサブシステム (MO) などに移動させる。
⑥ N_2 PURGE ランプが点灯している時に、第一細孔から第二細孔までの差動排気部は外さない (分析部にごみなどを吸い込むため)。
⑦ クリーニング時以外は EVAC スイッチは OFF にしない (EVAC スイッチを OFF にするときは必ず N_2 ガスの元栓を開く)。
⑧ EVAC スイッチを ON にした後、ERROR ランプが点灯しブザーが鳴ったら、直ちに RESET を押し EVAC スイッチを OFF にし N_2 ガスの元栓を開く。

§６　応用例

Fig. 3-A は、水/メタノール/酢酸混合溶液中 (49/49/2、pH 3.0) における遺伝子組換えヒト成長ホルモン (hGH、分子量: 22 kDa、等電点: 5.0) の ESI-MS スペクトルを示す。hGH の多価イオンは平均荷電数 14.8 の対称性分布を示した。一方、分岐環状オリゴ糖マルトシル-β-シクロデキストリン (G2-β-CyD) 存在下では hGH 由来の多価イオン分布は高電荷側へシフトした (平均荷電数: 15.8、Fig. 3-B)。さらに、hGH と G2-β-CyD のモル比 1:1 および 1:2 複合体あるいは付加物に相当するピークが観察された。この結果を他のスペクトル法 (蛍光、円二色性、NMR など) により得られた結果と総合すると、G2-β-CyD は hGH の比較的表面付近に位置する疎水性アミノ酸残基と相互作用することによって、本蛋白質分子内の疎水相互作用を弱め、高次構造をフレキシブルにすることが示唆される。[2)]

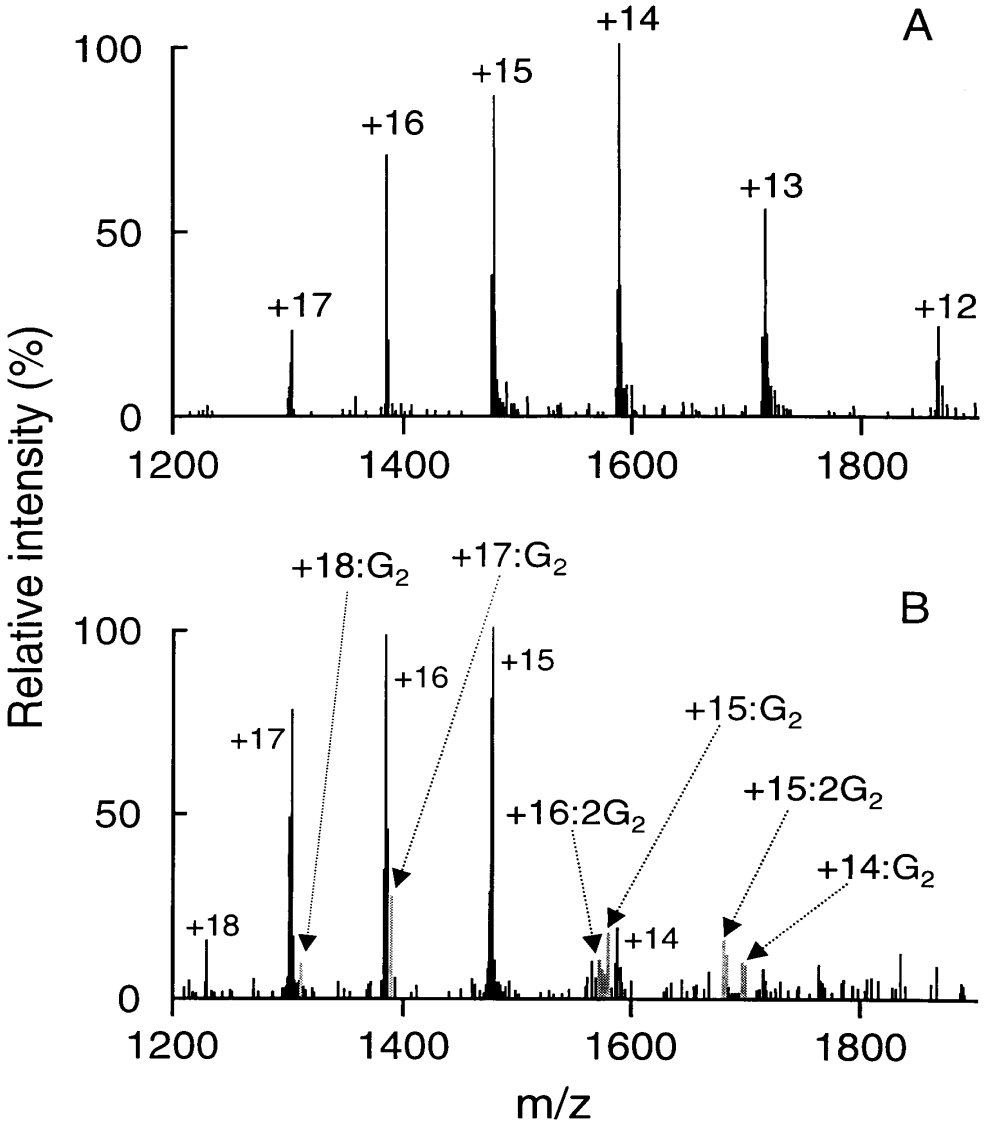


Fig. 3

§７　おわりに

大気圧イオン化法の出現により LC/MS の応用範囲は飛躍的に拡大し、医薬、農薬、工業材料など広領域での利用が実用レベルに到達した。取り扱いは、**§3**. に述べたように比較的簡単であるが、移動相溶媒の選択、キャピラリーや細孔の汚れの防止などに特に留意してご利用いただきたい。本装置が多くの研究者に活用され、研究の進展に役立つことを期待したい。

参考文献

1. 上野民夫・平山和雄・原田健一編「バイオロジカルマススペクトロメトリー」 (東京化学同人、1997)
2. 田尻慎一朗、田原僚子、時廣啓市、入江徹美、上釜兼人: 第 15 回シクロデキストリンシンポジウム講演要旨集、35-36 (1997).

レーザーイオン化質量分析計
（Bruker REFLEX™ MALDI-TOF MS）

薬学部　生化学研究室　三隅将吾；内線 4367

§１　はじめに

生体高分子は，難揮発性であるため，気相にイオン化するイオン化法の開発が難しく，ようやく1980年代になってタンパク質や核酸等をイオン化できる，いわゆるソフトイオン化法が実用化されてきた．これらのうち高速原子衝撃（fast atom bombardment; FAB）法，エレクトロスプレーイオン化（electrospray ionization; ESI）法，マトリックスアシステッドレーザー励起イオン化（matrix - assisted laser desorption ionization; MALDI）法等が，現在広く用いられている．基本的には，各々のイオン化によって生成したイオンは，どの質量分析法でも分離可能であるが，相性があるため，各々のイオン化法に適した質量分析計との組み合わせによって用いられることになる．

ここでは，Bruker REFLEX™ Matrix - Assisted Laser Desorption Time - of - Flight Mass Spectrometer (MALDI - TOF MS)について述べる。

§２　原理

MALDI-TOF MS

①イオン化法---　MALDI法

②質量分析計---　TOF MS

①Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization（MALDI）法について

MALDI法では，イオン化のためにマトリックスを用います．（表１参照）

マトリックスはサンプルと同じ溶媒に溶け，かつ溶媒の蒸発とともにサンプル分子を取り込みながら結晶化します．さらに，使用するレーザーの波長に対して吸収を持ち，サンプルをイオン化させます．サンプルのイオン化には，マトリックスがまずレーザー光の照射を受けて，励起状態となり，次にその励起状態のマトリックスから得られるエネルギーによりサンプルが蒸発し，最終的にプロトン移動によってサンプルは，イオン化されます．（図１参照）

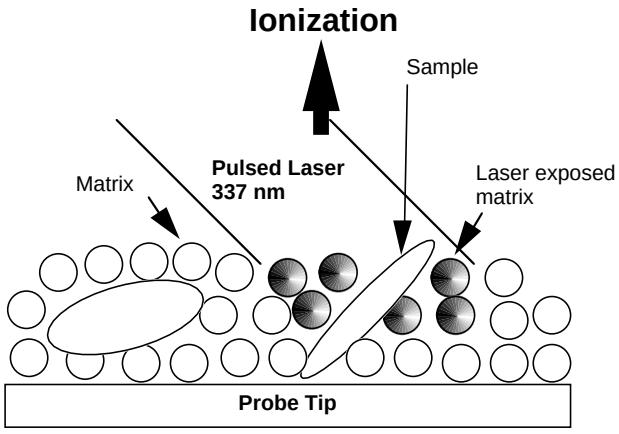


図１　MALDI法イオン化概念図

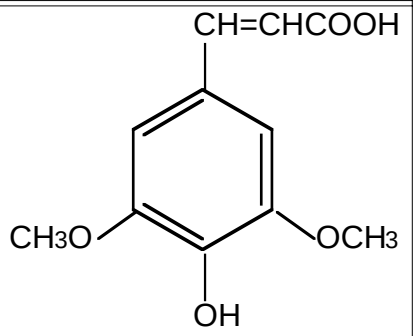
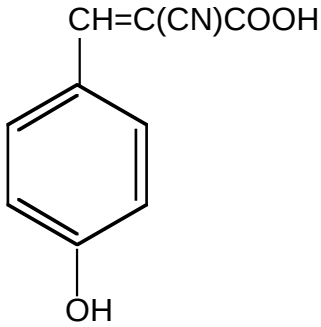
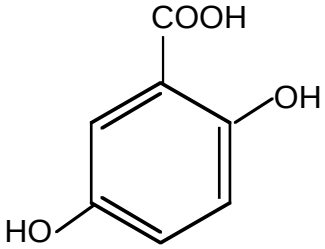
Matrix	Application	Structure
Sinapinic acid (SA) MW 224.07	・Peptides ・Proteins	
Alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CCA) MW 189.04	・Peptides ・Proteins	
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) MW 224.07	・Peptides ・Carbohydrates ・Glycolipids ・Polar synthetic polymers	

表１　代表的なマトリックス

②Time-of-Flight (TOF) MSについて

イオン化したサンプルは，加速電圧によって運動エネルギーを与えられ，高真空のフライトチューブ内で自由飛行を始めます．フライトチューブ内の反対側にはディ

テクターが設置されています．このディテクターに分子量の低い分子が早く到達し，高い分子は後から到達することで分離が行われ，ディテクターまでの時間を測定することでその分子の分子量が決定できます．（図２参照）

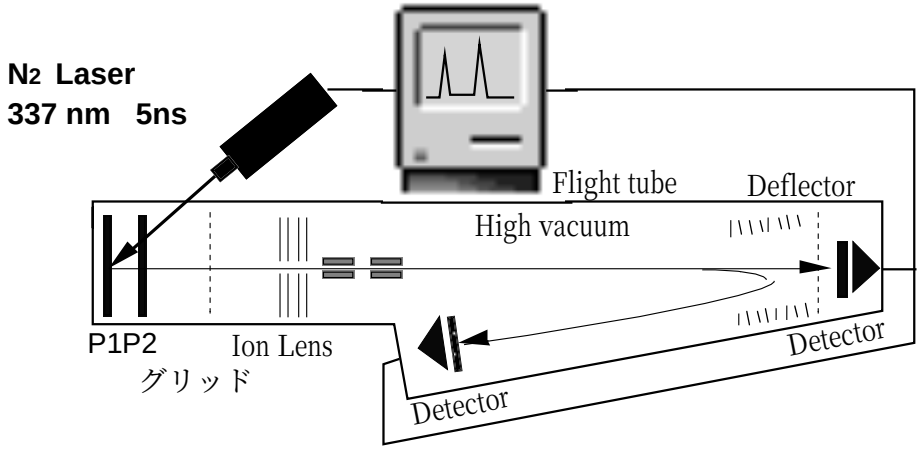


図２　TOF MSの概略

§３　理論

加速領域内に存在する質量m（amu）のz価イオンは一定加速電圧Ｖ（volt）の電場強度により加速エネルギー（zeV）を与えられる．場の存在しない自由飛行領域に入射されたイオンのもつ運動エネルギーは加速エネルギーと等しいので式（１）が成立し，この式（１）よりイオンの速度v（m/sec）は式（２）で表される．

$$mUv^2/2=zeV \qquad (1)$$

$$v=(2zeV/mU)^{1/2} \qquad (2)$$

したがって，イオンが距離Ｌ(m)（L=X1+X2）を飛行する時間 t（sec)は

$$t=L/v \qquad (3)$$

であるので，式（２），（３）より基本式である式（４）が導かれる．

$$m/z=2eV(t/L)^2/U \qquad (4)$$

通常，TOF MSにおいて加速電圧Ｖと飛行距離Ｌは一定であるので，式（４）は次のようにあらわすことができる．

$$m/z=Kt^2 \qquad (5)$$

$K=2eV/UL^2=1.929 \times 10^8 V/L^2$

e: 電子の電荷【$e=1.602 \times 10^{-19}$ (c)】

U: 原子質量単位（atomic mass unit : amu）

【$U=1.6605 \times 10^{-27}$ (kg)】

すなわち，イオンの質量（m/z）は飛行時間（ｔ）の２乗に比例することがわかる．したがって，実際の測定においては式（６）における係数aとbを既知の試料を用いたキャリブレーションにより求めておき，未知試料のイオンの飛行時間を質量数に換算する．

$$m=at^2+b \qquad (6)$$

a, b : 定数

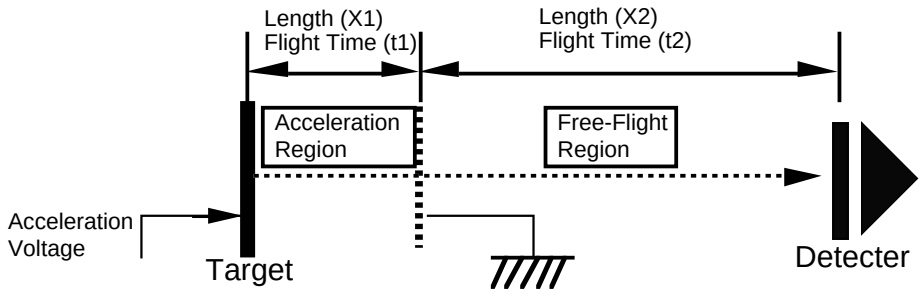


図３　TOF MSの概念図

キャリブレーション:　Matrix - Assisted Laser Desorption Ionization Time - of - Flight Mass Spectrometer （Model Reflex）では，Calibrantを用いることで未知試料の真のMassを測定します．実際には，CalibrantをTA buffer（0.1%TFA/acetonitril (2:1)）で1～10 pmol/μlに調製後，未知試料と1:1で混合し，更にその混合溶液とMatrixを1:1で混合したものを測定することで真のMassを得ます．以下に推定される分子量と選択すべきCalibrantを示します.

分子量	選択すべきCalibrant
Mw<5000	Angiotensin II human, Substance P, ACTH(18-39), Insulin Bovine
5000<Mw<10000	Insulin Bovine, Ubiquitin, Cytochrome C horse
10000<Mw<60000	Cytochrome C horse, Myoglobin horse, Trypsin bovine, BSA
60000<Mw	BSA, BSA-dimer

表２　代表的なCalibrant

Calibrants	平均分子量	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{++}$
Angiotensin II human	1046.192	1047.200	-
Substance P	1347.728	1348.736	-
ACTH(18-39)	2465.720	2466.728	-
Insulin Bovine	5733.549	5734.557	2867.728
Ubiquitin	8564.835	8565.843	4283.425
Cytochrome C horse	12360.080	12361.088	6181.048
Myoglobin horse	16951.457	16952.465	8476.736
Trypsin bovine	23311.53	23312.54	11656.77
BSA	66430	66431	33216
BSA-dimer	132858	132859	66430

表３　代表的なCalibrantの$[M+H]^+$および$[M+2H]^{++}$

§４　方法

サンプル調整法: サンプル（蛋白質）は，Pharmasia BiotechのResource^{TM}RPC等のHPLCカラムで脱塩されることをお奨めいたします．以下にサンプルの調製時に可能な限り除去すべきものを示します．

不揮発性物質
Salts （e.g. NaCl, $CaCl_2$, KH_2PO_4）
Detergent （e.g. Tween, Triton, SDS）
Chaotropic agent （e.g. Urea, Guanidinium salts）
solvent （e.g. DMSO, Glycerol）

これらの物質が測定サンプル中に混合していた場合には，正確な分子量が得られない，もしくはシグナルを得られないこともあります．たとえば，

①サンプル中に多量の塩が混入していた場合（溶媒がNaCl溶液），その塩とサンプルがクラスターを形成してMass peakが非常にブロードになり良い結果が得られない，またはシグナルが得られなくなる（イオン化が妨げられる）可能性があります．

②不揮発性の溶媒（DMSO）を使用した場合，測定用の結晶を形成することができません．

サンプル量:

分子量[a)]	測定試料の濃度[b)]	Matrix[c)]
Mw<5000	1~2 pmol/μl	CCA
5000<Mw<10000	2~3 pmol/μl	CCA, DHB
10000<Mw<60000	3~5 pmol/μl	SA, DHB
60000<Mw	<5 pmol/μl	SA, DHB

表４　測定試料の分子量と選択すべきMatrix

<注意事項>
a) 測定試料の分子量
b) 測定試料の濃度とは，最終的にMatrixと混合する直前のサンプル溶液の濃度をいいます．
①凍結乾燥品の場合
　TA bufferで表４の濃度に調製する．
②溶液の場合
　表４の濃度にTA bufferで希釈する。

③Internal calibrationをする場合

上記の2倍程度の濃度の測定試料にinternal calibration溶液を等量加え調製する.

・TA buffer: 0.1 % trifluoroacetic acid in water/acetonitrile (2:1).

・Internal calibration溶液: 測定するサンプルの推定分子量に近いCalibrantを表２より選択し、そのCalibrantをTA bufferで1~10 pmol/μlに調製したもの.

c) サンプルの推定される分子量に応じてMatrixを選択する.

<略号説明>

CCA: Alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid

SA: Sinapic acid

DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid

測定概要:

●MatrixとしてSA, CCAを用いる場合

1) サンプルをTA bufferで適切な濃度の測定試料として調製する. （表４参照）
2) TA bufferに飽和させておいたMatrix溶液と測定溶液とを1:1で混合する.
3) Matrix溶液と測定溶液の混合溶液1~2μlをprobe tip上にのせ真空乾燥させる（SAのみ）.
4) Microscopeでサンプルの状態を観察する.
5) Probe tipをセットし、測定する.

Matrix溶液と測定試料の混合溶液の乾燥操作法

Matrix	乾燥操作
CCA	測定溶液をMatrix溶液と混合後、常圧室温で乾燥する.
SA	測定溶液をMatrix溶液と混合後、真空乾燥させる.

●MatrixとしてDHBを用いる場合

1) サンプルをTA bufferで適切な濃度の測定溶液として調製する. （表４参照）
2) DHBを10mg/mlになるように20 % ethanolに溶解する.
3) 1μlのDHB溶液と3μlの測定溶液を混合する。
4) DHB溶液と測定溶液の混合溶液1μlをprobe tip上にのせる。
5) Hair dryerですばやく乾燥させる。
6) Microscopeでサンプルの状態を観察する。
7) Probe tipをセットし、測定する。

Matrix溶液と測定試料の混合溶液の乾燥操作法

Matrix	乾燥操作
DHB	SampleをMatrixと混合後、Hair dryerですばやく乾燥させる.

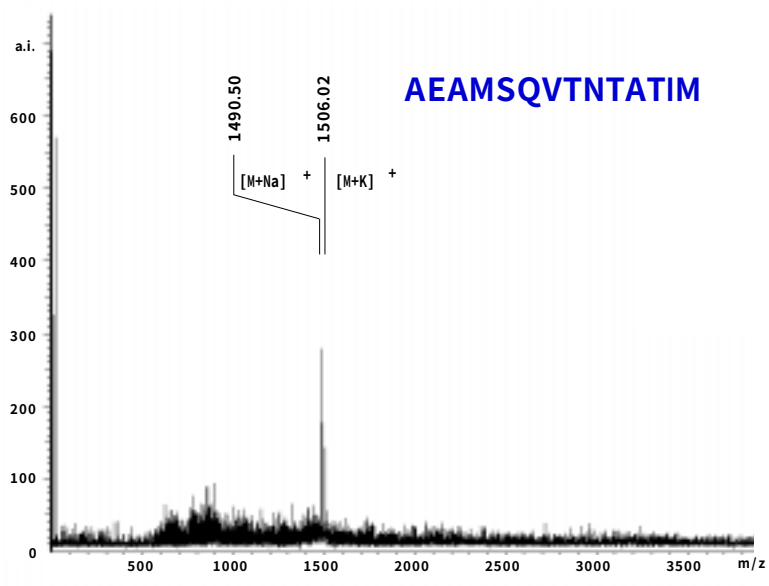


図４　MALDI-TOF MSによる測定例
HIV-1 内因性プロテアーゼインヒビターp2^{gag} peptideの検出
（マトリックスとしてCCAを使用）
Shoji, S., *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) in press.

§５　仕様

Bruker REFLEX^{TM} Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)の仕様を以下に示す.

機種	：	Bruker REFLEX^{TM} Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometer
反射型MALDI-TOF	：	総飛行距離　165 cm，グリッドレスイオンリフレクター，正/負イオン測定，最大加速電圧　30kV
サンプル導入	：	SCOUT　26サンプルターゲット，コンピュータコントロールX-Yステージ，CCDカメラによるターゲットモニター
データ処理システム	：	SUN，17インチカラーモニター，XMASSソフトウェアー，UNIXソフトウェアー
データアクイジション	：	1GHz　デジタイザ

§６．利用上の注意事項

①タンパク質試料溶液は，一般に無機塩を含んでいるが，質量分析計による測定では脱塩した試料を用いた方が，良いスペクトルを得ることができる.

②レーザーのパワーは，スペクトルの質を決定する重要なパラメーターである．パワーを上げれば上げるほど初期運動エネルギーのバラツキが大きくなり，精度が低下する．逆にあまりパワーを下げてしまうと，検出に十分なイオンを得ることができない．良いスペクトルを得るためには，目的のタンパク質がイオン化する最低強度の

レーザーパワーを見つけることが重要である．

③スペクトルの質は，マトリックス分子の結晶構造がうまくできているかどうかに大きく依存する．一般的に，無機塩やグリセロールを含む試料や，界面活性剤や高濃度の尿素，TFAなど，タンパク質の変性剤や可溶化剤に溶解した試料では，マトリックスの結晶がうまくできず，良いスペクトルを得ることは難しい．

④MALDI法では次の場合にイオン化されやすい．

1) 分子量　　小>大
2) 疎水性　　大>小（分子量が同程度なら）
3) 正電荷の数　　大>小（プラスイオンを検出するポジティブモードの場合）

MALDI法でのイオン化を規定している因子や機構は十分に明らかになっていないので，ここにあげたパラメータ以外にも未知のパラメータが関係していると考えられる．

§７　応用例

①アミノ酸配列分析法

MALDI-TOF MSは，磁場型のMSに比べると分解能の点で劣っていたため，高分解能を保つためにそれなりの測定技術を要していたが，近年この問題を大幅に改善するDelayed Extractionが開発され，MALDI-TOF MSをもちいたアミノ酸配列分析法は飛躍的に進歩した．このDelayed Extractionとリフレクターを用いることにより，フラグメントイオンを分離する『MS/MS』としての機能を重視されるようになった．タンパク質のアミノ酸配列分析法としては，PSD法，CID法，酵素を用いたアミノ酸配列決定法等がある．

●Post source decay(PSD)-Low energy collision法

分子がイオン化されることによりもつ過剰エネルギーを使いPost-source decay（PSD）を起こします．これは分子が飛行中にメタステーブルディケイを起こしフラグメントイオンが生成するものです．ここで生成したフラグメントイオンをリフレクターのポテンシャルを変化させること（Vrefを30 kVから徐々に下げていく）によりMassをセレクトし，異なる分子量のイオンを選択的に測定します．その後，Massをキャリブレーションし一つのスペクトルとして表し（図６参照），そのフラグメントパターンからシーケンスを解析する方法です．はじめに余分な分子（マトリックスや２価イオン）をディフレクターのパルス電場によりカットして測定分子だけをフライトチューブ側に導いて測定を開始します．リフレクターのポテンシャルを数段階ステップさせ測定を開始します．最後にキャリブレーションを行い一つのスペクトルにして結果となります．

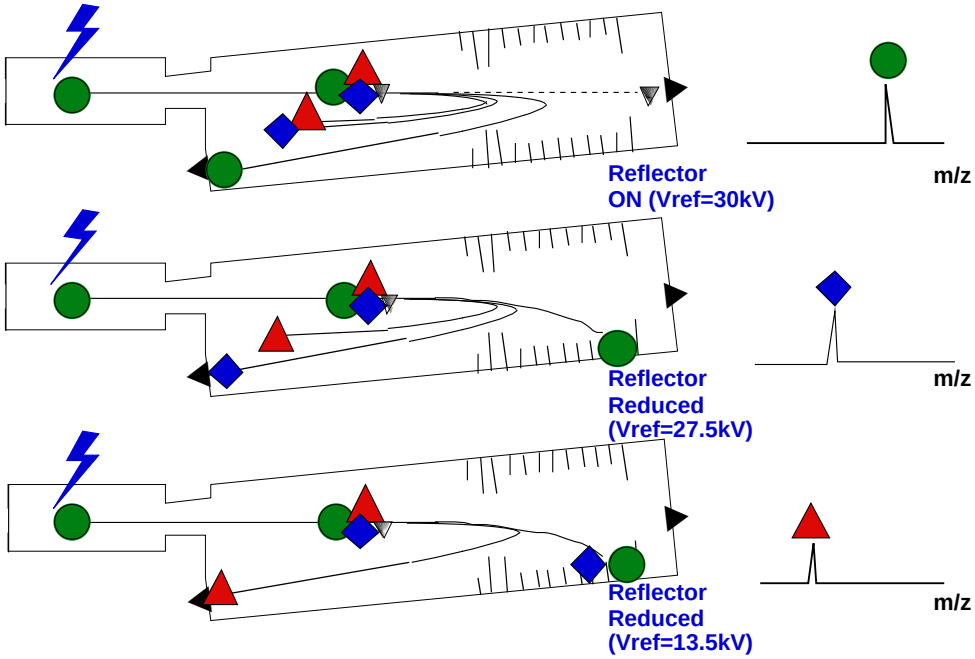


図５　PSDの概念図

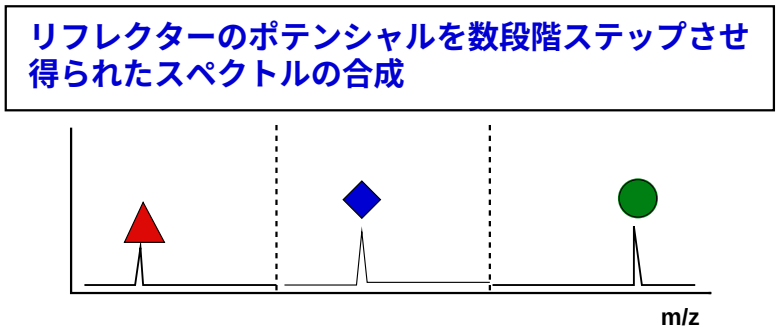


図６　PSDによって得られたスペクトルの合成

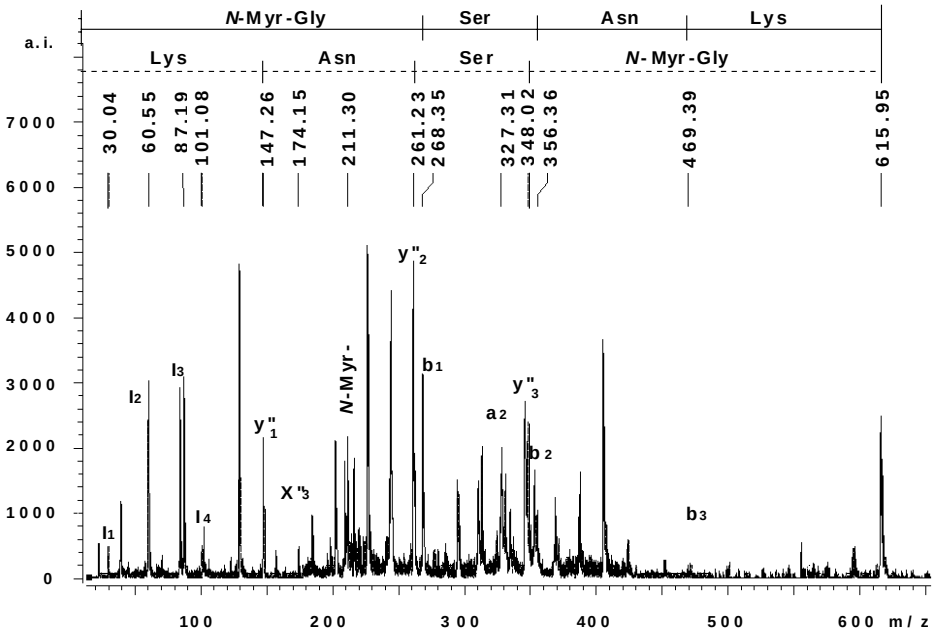
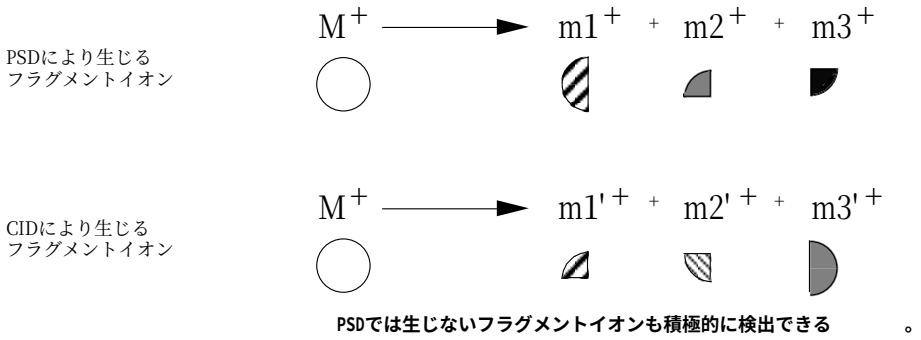


図７　PSD法によって得られた*N*-Myr-GSNK peptideのアミノ酸配列

●Collision induced dissociation(CID)-High energy collision法

衝突活性化により起こるイオンの分解によって生じるフラグメントイオンを，リフレクターで分離してスペクトルを測定する方法．High energy collisionであるため**PSDでは生じないフラグメントイオンも積極的に検出できる．**具体的にはLeuとIleの違いを質量分析的に決定できるばかりか，翻訳時/後修飾タンパク質の修飾部位周辺構造をより明確にできる．基本的にはフラグメントイオンの分離方法は，PSD法と同じであるが，サンプルプレート上でイオン化された分子イオンにアルゴンなどの不活性ガスを吹き付けることにより，分子イオンを不活性ガスに衝突させ，分子イオンのフラグメントイオンを積極的に生じさせる点がPSD法と異なる．



PSDでは生じないフラグメントイオンも積極的に検出できる　。

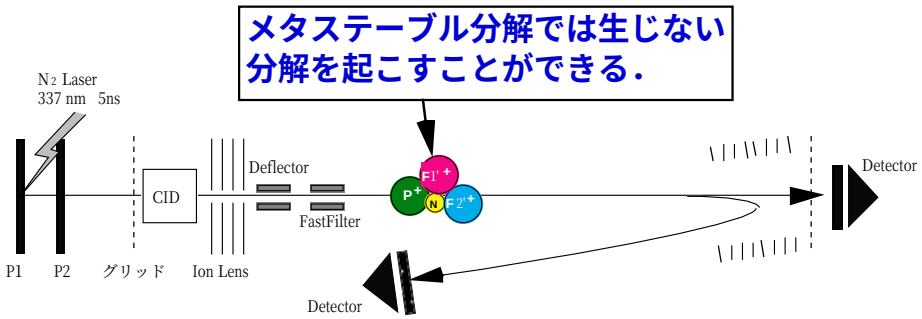


図８　CIDの概念図

●酵素を用いたアミノ酸配列決定法

目的のペプチドのN末端またはC末端のアミノ酸が１つずつ欠損したラダー状の反応混合物を調製し，これをMALDI-TOF MSで測定して，各ピークの質量差から相当するアミノ酸を同定する．このラダー状の混合物を調製するには，カルボキシペプチターゼやアミノペプチターゼで目的のペプチドを消化する方法などがある．

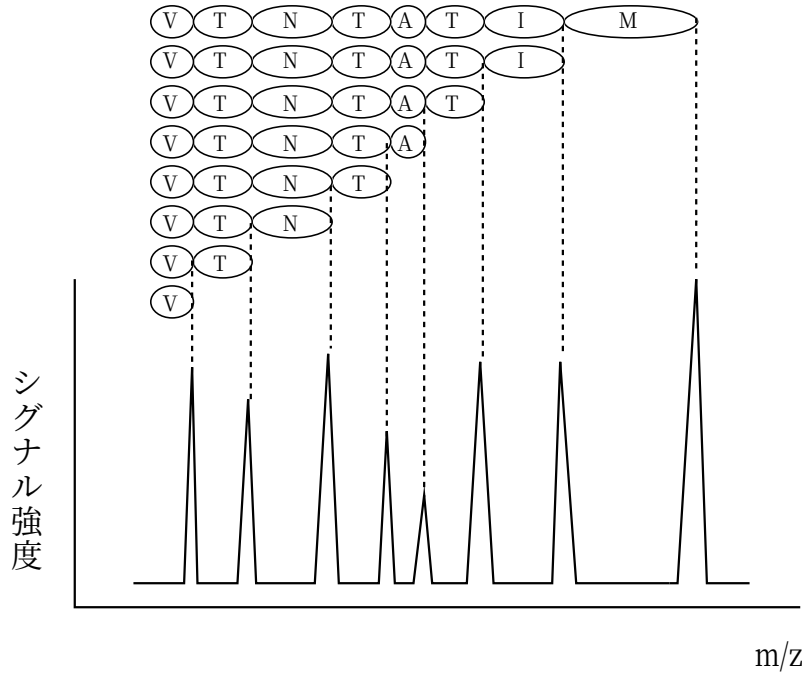


図９　酵素を用いたアミノ酸配列決定法の概念図
（カルボキシペプチターゼの場合）

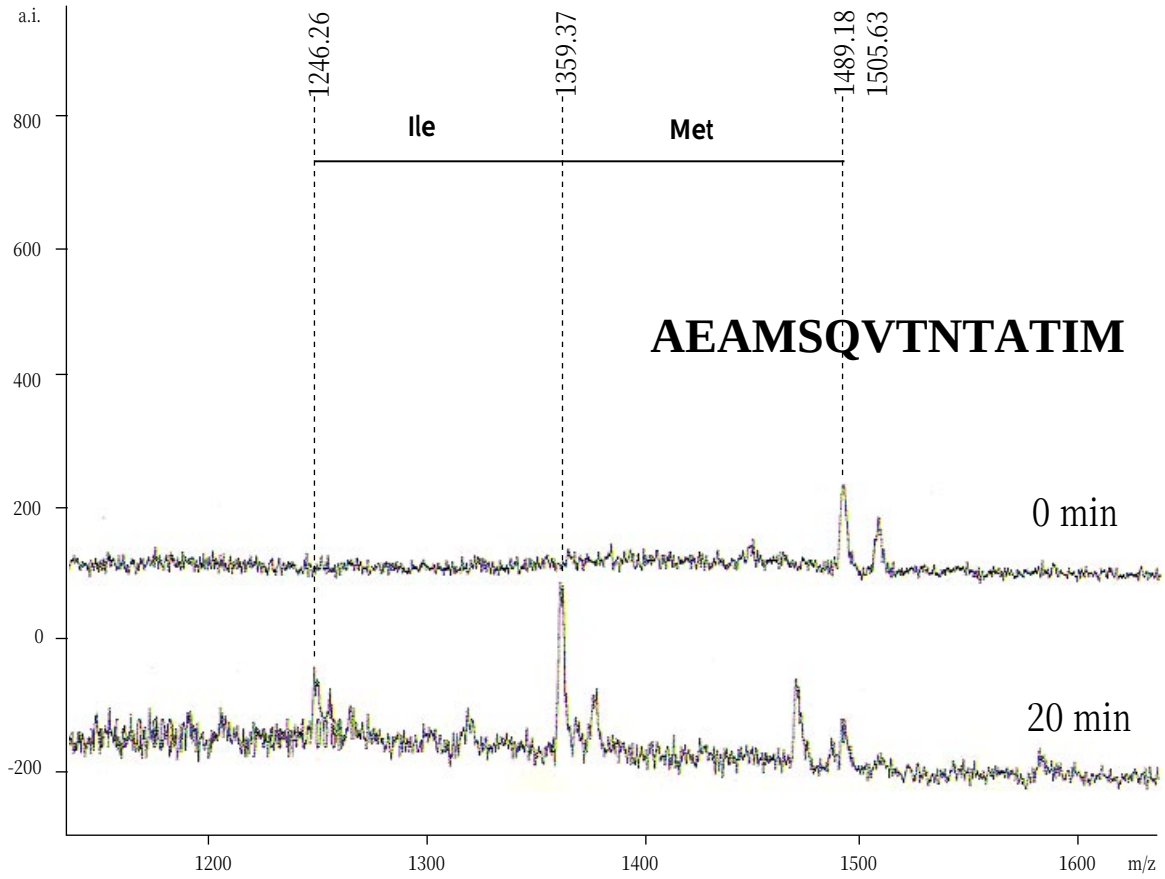


図１０　HIV-1 p2^{gag} peptide（AEAMSQVTNTATIM）のカルボキシペプチターゼYを用いたC末端アミノ酸配列分析（カルボキシペプチターゼYを用いて20分間酵素反応後，MALDI-TOF MSを用いてC末端のアミノ酸配列を決定した例）

②MALDI-TOF MSを用いた翻訳時・後修飾の解析

多くのタンパク質は，その分子自体の細胞内での発現量や合成，分解速度だけでなく，脂肪酸やリン酸，糖鎖の付加や脱離等の翻訳時・後修飾によってもその活性や機能が調節されている．したがって，一般にタンパク質の構造と機能，相互作用を知るためには，の翻訳時・後修飾の解析が必要である．その一例として，ここに翻訳時修飾であるタンパク質のミリストイル化の解析法を示す．

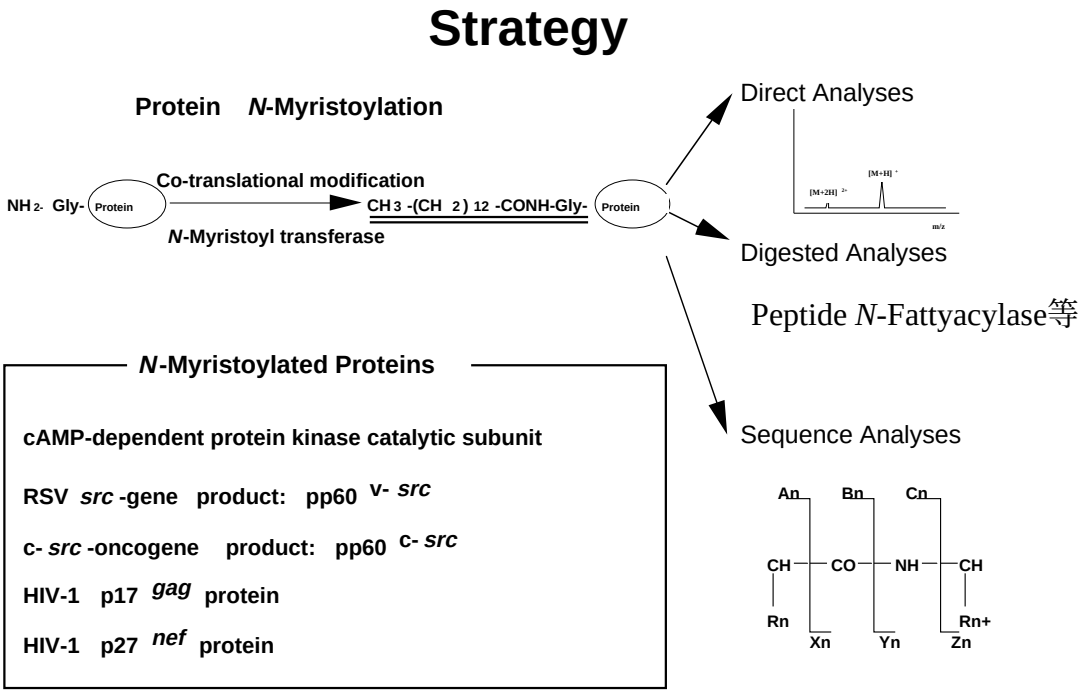


図１１　MALDI-TOF MSを用いたタンパク質ミリストイル化解析法のStrategy

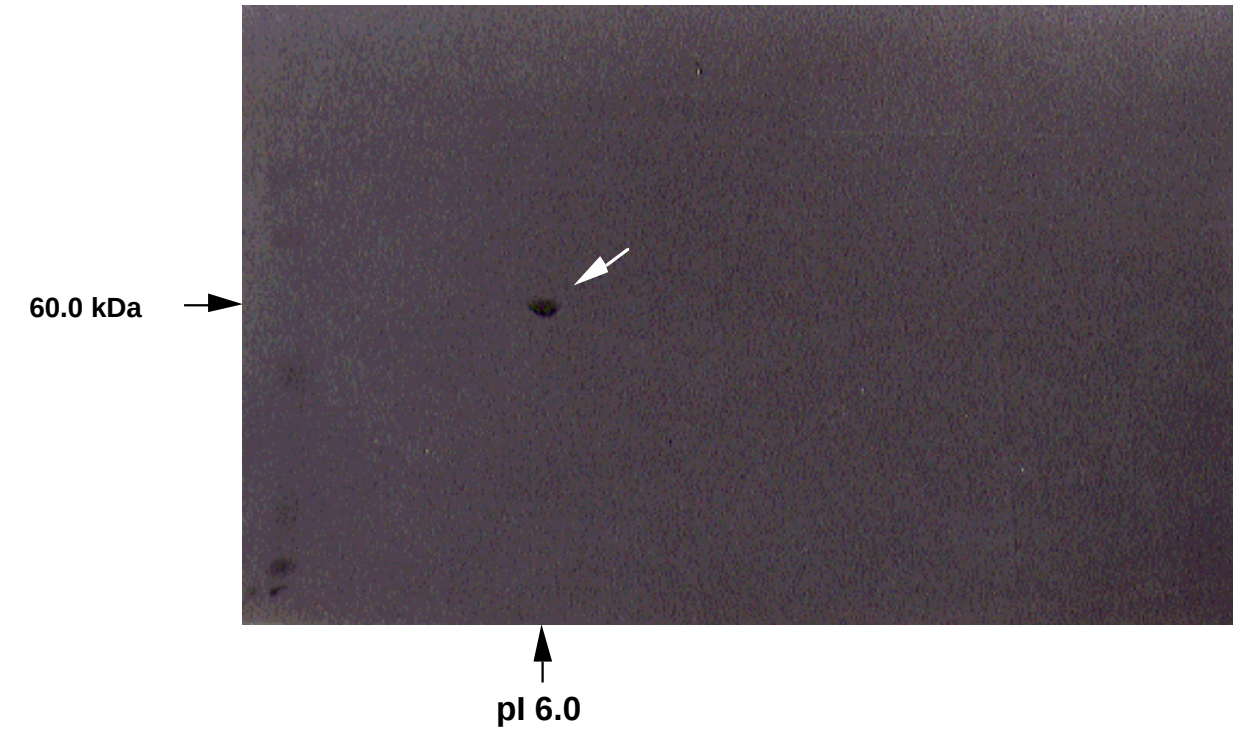
●アミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列の化学的同定法

1982年，仔牛心筋由来cAMP-dependent protein kinase触媒サブユニットの全一次構造決定の際，タンパク質のアミノ末端に炭素数14の長鎖飽和脂肪酸であるミリスチン酸が酸アミド結合を介して共有結合していることが庄司により見いだされて以来，今日までに種々のアミノ末端ミリストイル化タンパク質が報告されている（図１１参照）．

タンパク質のアミノ末端ミリストイル化は，細胞内に存在する*N*-myristoyl transferaseによって触媒され，ミリストイル基供与体であるmyristoyl-CoAから，ミリストイル基がタンパク質のアミノ末端Gly残基へ酸アミド結合を介して翻訳時に転移されると考えられている．

これまで，種々のアミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端配列がcDNAから推定されているが，これらアミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列を直接化学的に同定する方法は確立されていなかった．そこでここに免疫学的手法およびペパーテクノロジーを駆使し，MALDI-TOF MSを用いたアミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列の化学的同定法をここに述べる．

①ミリストイル化タンパク質の同定及び分離



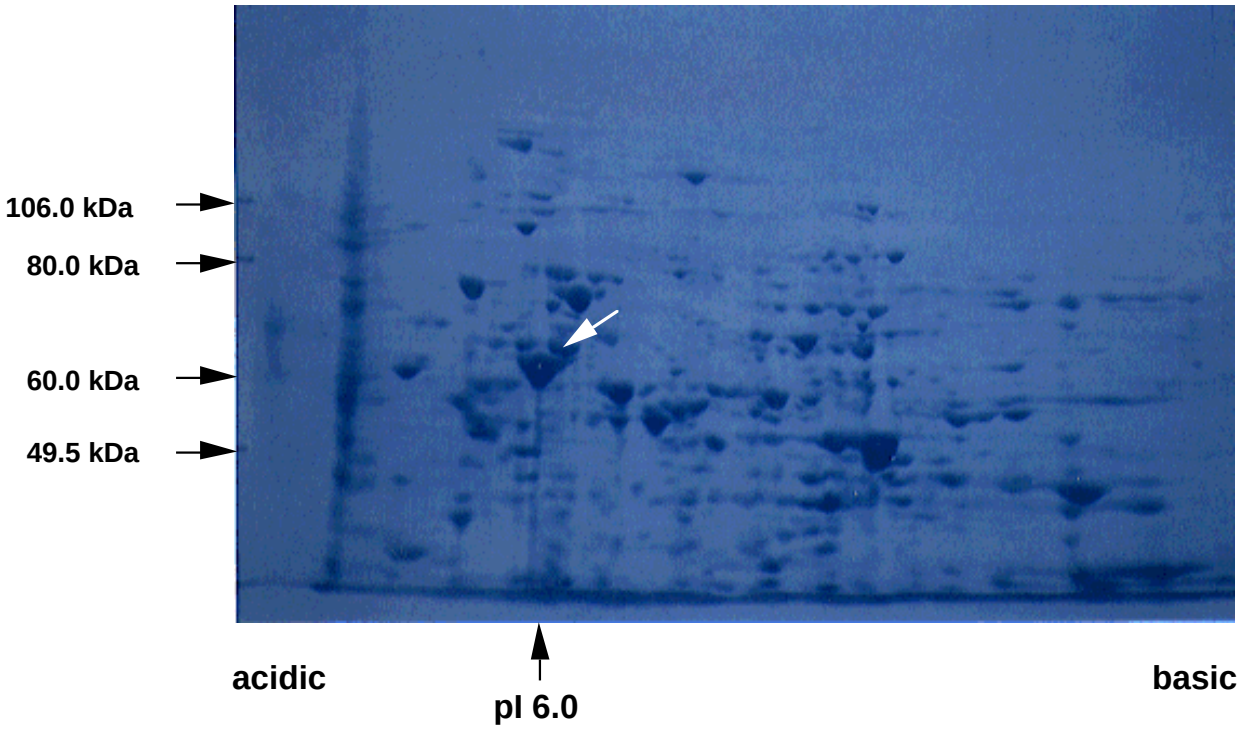


図１２　Immunoblotting Analysis after Two-Dimensional Electrophoresis（上：Sheep anti c-*src* polyclonal antibody を用いた *N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$ の同定，下：Coomassie brilliant blue G-250を用いた*N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$の検出）

ヒト結腸腺癌細胞COLO320DMのcell lysateを二次元電気泳動後，ブロッティングを行い，一次抗体としてSheep anti c-*src* polyclonal antibodyを用いてwestern immunoblotting analysisを行ったところ等電点6.0に分子量60kDaの*N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$を同定することができた（図１２上）．次に，*N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$のアミノ末端アミノ酸配列を決定するために先程と同様に二次元電気泳動後，ブロッティングを行い，Coomassie brilliant blue G-250で染色し，***N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$**に相当する部分を切り取り，そのPVDF膜をtrypsin消化後，90 % EtOHを用いて12時間振とうし，得られた膜を0.1 % TFAを含む30 % アセトニトリルを加え，10分間超音波処理した溶液をHPLC（column: PICO・TAG column, A buffer: 30 % CH_3CN containing 0.1 % TFA，B buffer: 80 % CH_3CN containing 0.1 % TFA, Gradient: 0→100 % B, 30 min）で分離しMALDI-TOF MSで分析する．

②アミノ末端ミリストイル化ペプチドの同定

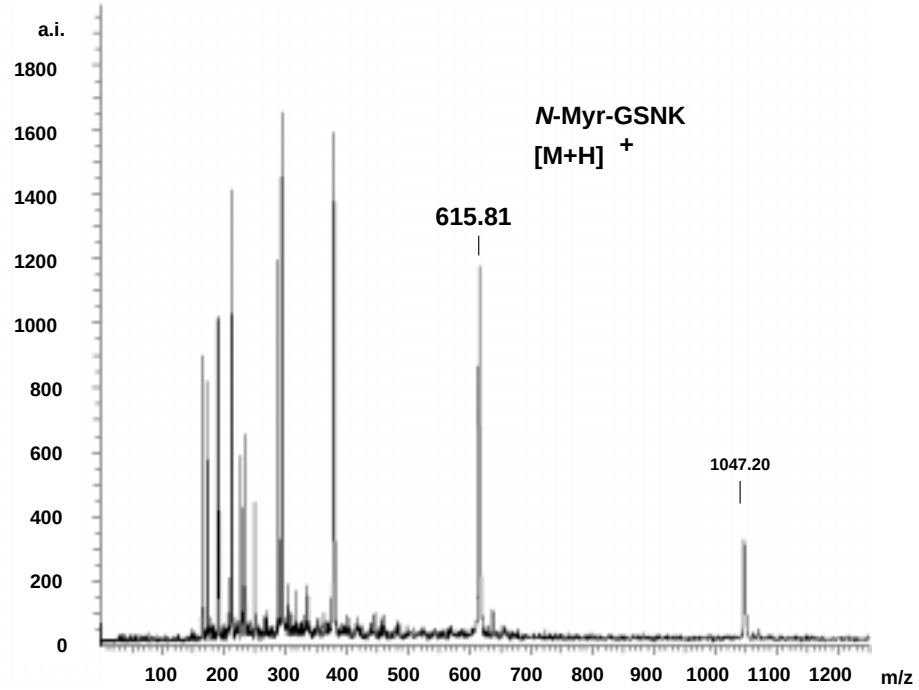


図１３　*N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$由来*N*-Myr-GSNK peptideの同定
Shoji, S., *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:632-639 (1995)

①で得られたHPLCのフラクション（retention time 18 min）をMALDI-TOF MSで分析したところ，*N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$のアミノ末端tetrapeptideである*N*-Myr-GSNK peptideを同定することができた．また確認のために，このHPLCフラクションを凍結乾燥後，ミリストイル基切断活性を有するPeptide *N*-Fattyacylaseを用いて酵素反応後，HPLC（column: PICO・TAG column，A buffer: 30 % CH_3CN containing 0.1 % TFA，B buffer: 80 % CH_3CN containing 0.1 % TFA，Gradient: 0→100 % B, 30 min）で分離後，得られたフラクション（retention time 2 min）を気相プロテインシーケンサーで分析を行った結果，

GSNK peptideであり，*N*-Myr-pp60$^{c\text{-}src}$のcDNAから推定されたアミノ末端アミノ酸配列と一致し，アミノ末端ミリストイル化タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列の化学的同定法を確立することができた.

●ミリストイル化ペプチドの化学的同定法

アミノ末端が本当にミリストイル化でブロックされているかどうかは，先程と同様にミリストイル化を受けていると思われるタンパク質のアミノ末端ペプチドを分離した後，Peptide *N*-Fattyacylaseを用いて酵素反応後，Peptide *N*-Fattyacylaseによってミリストイル基が切断されたために生じる質量の差を確認すればよい.

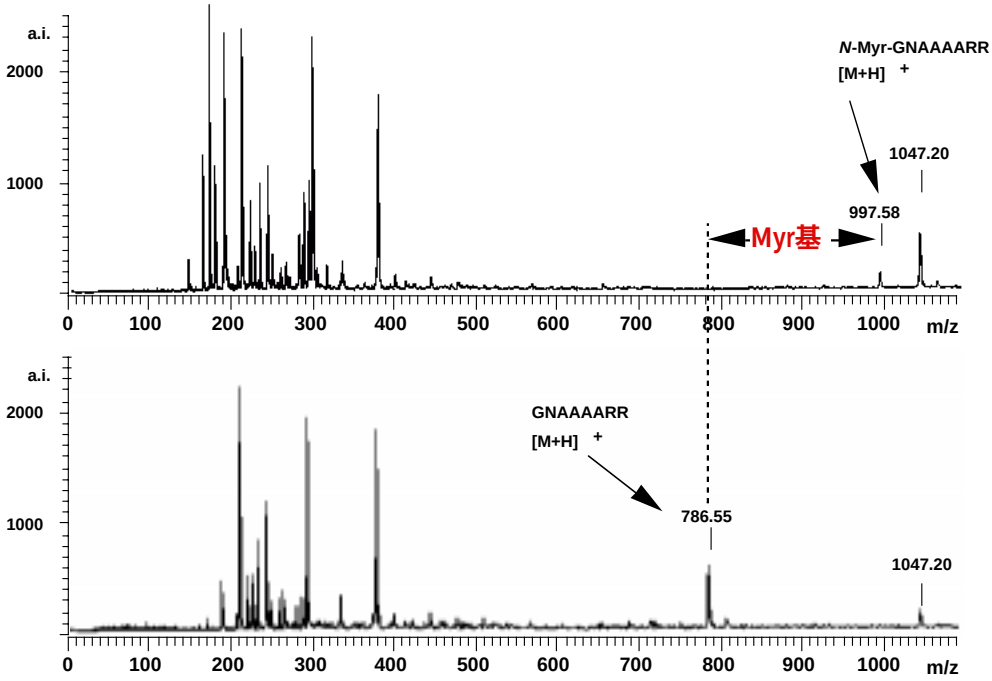


図１４　アミノ末端ミリストイル基の同定

Peptide *N*-Fattyacylaseによって*N*-Myr-GNAAAARR peptideのミリストイル基を切断した例

示差走査熱量測定装置
(PERKIN ELMER DSC7)

薬学部　製剤学研究室　平山文俊；内線 4161

§１　はじめに

物質が化学的あるい物理的変化を起こすと熱の発生や吸収が起こる。このような熱変化を温度あるいは時間の関数として測定することにより、物質中で起こる状態変化を解明することができる。熱分析法は「物質の温度を調節されたプログラムに従って変化させながら、その物質のある物理化学的性質を温度の関数として測定する一群の技法」と定義されている。したがって、測定対象となる物理化学的性質に応じて様々な技法がある。たとえば、温度の関数として重量変化を測定する熱重量測定（Thermogravimetry, TG）、標準試料との温度差を測定する示差熱分析（Differential thermal analysis, DTA）、エンタルピーを測定する示差走査熱量測定（Differential scanning calorimetry, DSC）、発生したガスの性質や量を測定する発生気体分析（Evolved gas analysis, EGA）などがあり、その他、電気・磁気・光学・力学特性を測定する技法もある。熊本大学機器分析センターには、熱分析の代表的測定法であるDSC と TG が設置されている。

§２　原理

２.１ 示差走査熱量測定（DSC）

DSC は、試料および基準物質の温度を一定のプログラムに従って変化させながら試料と基準物質に対するエネルギー入力の差を温度の関数として測定する技法であり、エネルギーの測定法の違いにより入力補償 DSC と熱流束 DSC に区別される。入力補償 DSC 装置の基本的構成を図１に示す。試料と基準物質を同時に一定速度で加熱あるいは冷却し、両者間の温度差を温度センサーで検出する。温度差が生じた場合その差をゼロにするように示差電力補償回路より電力を供給しながら一定速度で加熱あるいは冷却する。したがって、両物質の温度を等しく維持するために要した電気エネルギーは、走査した温度範囲における試料の熱含量変化に対応し、時間を横軸として基準物質の温度とともに記録される。一方、熱流束 DSC 装置の場合、熱容量が大きな材料（コンスタンタン）からなるヒートシンク（熱溜）上に温度センサーと試料ホルダーがセッ

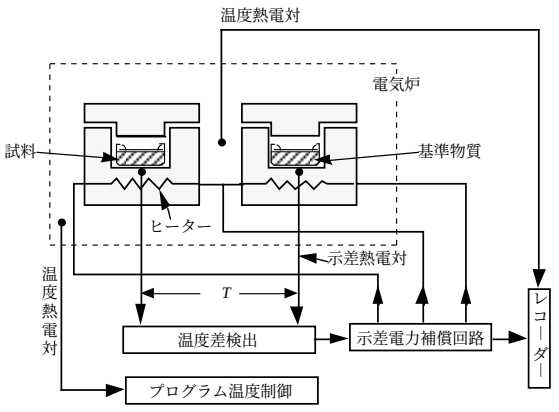


図１．入力補償ＤＳＣ装置

トされており、熱はヒートシンク、温度センサー、ホルダーを通して伝達される。試料に熱変化が起こるとヒートシンクとホルダー間に温度差が生じ、それを温度センサーで測定する。熱量既知の物質で温度差と熱量の関係を求めておけば、温度差を熱量に変換することができる。本センターには、熱量を直接測定する入力補償 DSC が設置されている。

２.２ 熱重量測定（TG）

TG は試料を一定速度で加熱しながら重量変化を連続的に測定する方法であり、1915年に本多光太郎により考案されて以来多くの研究がなされている。図２は TG の概念図を示す。試料と基準物質を同時に一定速度で加熱し、その過程で試料に重量変化が起こると天秤ビームの平衡がくずれて傾く。この傾きを電気的に検知・増幅して重量変化を求め、温度に対して記録する。TG を利用して、試料中の結晶水や溶媒の定量、蒸発や昇華速度の測定、揮発性物質の生成を伴う熱反応の追跡などを行うことができる。図３は、例として硫酸銅・５水和物の TG 曲線を示す。100 ℃ 付近から結晶水２分子に相当する重量減少が観察され、250 ℃ および 300 ℃ 付近で結晶水それぞれ２分子および１分子に相当する重量減少が起こり、硫酸銅・５水和物は３段階で脱水されることがわかる。

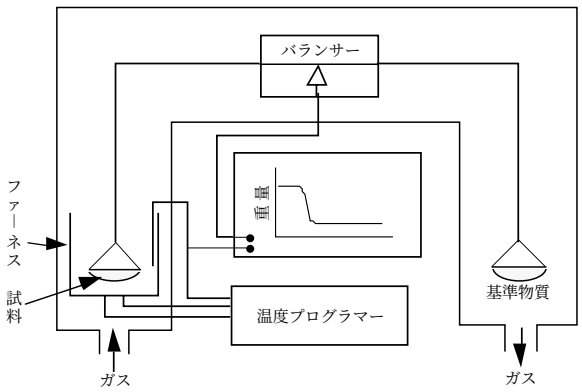


図２．ＴＧの概念図

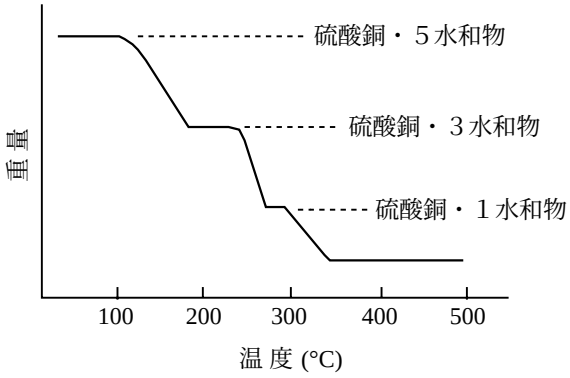


図３．硫酸銅・５水和物のＴＧ曲線

(M.E.Brown, "Introduction to Thermal Analysis", Chapman and Hall, London, 1988, pp.7-22)

§３　仕様

機種：パーキンエルマー社製 DSC 7（入力補償型、最大感度 8 μW/cm）
加熱・冷却速度 0.1～500 ℃/min（0.1 ℃ ステップ）
パーキンエルマー社製 TGA 7（天秤感度 0.1 μg）
昇温速度 0～200 ℃/min（測定温度 0～1000 ℃)
冷却装置：パーキンエルマー社製 JSC イントラクーラー２
コンピュータ部：DEC PC 466D2LP

§４　方法

1. 前準備

・エアコンの温度を 25℃ に設定する
・主電源を ON 後，パージガス (N_2) を流す
・DSC 7 本体，TAC 7/DX (温度コントローラー)，インタークーラー，プロッターの電源 ON
・装置が安定するまで約 30 分間待つ
・CPU 電源 ON
・Login の後に peta (半角) と入力後リターンキーを押す
・Password はリターンキーのみ入力 (メインメニューへ)する
注）測定室内の除湿器の電源は常にON 状態にしておくこと

2. 測定操作

・サンプルホルダー (左) にサンプルをセット (右はリファレンス)する
・メインメニュー内の「Run system」を立ち上げる
・「Set up and run」をクリックする
・Sample parameter，Temperature program，Display parameter などの測定条件を設定する
・このとき File name を入力しておくと測定データは自動的に保存される
・「Start run」をクリックし，測定開始する
・測定中，「Modify parameter」をクリックすると測定条件の設定画面に戻り，設定の一部を変更することができる
・測定を続ける場合はサンプル交換後，測定終了画面から「Set up and run」をクリックする
注）測定温度範囲は -50 ～ 250℃，この範囲外で測定する場合は担当者に相談して下さい。

3. 各種計算およびデータ出力

・「Recall fill」を選択後，「Recall first」および「DSC data」をクリックする
・目的のデータを選択すると画面に測定結果が表示される
・「Optimize data」でデータ (曲線) の拡大・縮小，傾きの変更などのデータの最適化を行う
・「Select calc」でピーク計算や Onset 計算，部分面積計算などの各種計算を行う
・印刷したい画面で「Print screen」キーをクリックする
注）データ解析に関する詳細は備え付けのマニュアルを参照して下さい

(複数のデータを同時に書く場合)

・「Recall fill」を選択後，「Recall more」および「DSC data」をクリックする
・書かせたいデータを複数選択し，実行する
・「Swap curves 」および「Shift Y」を用いてピーク間隔や並べる順などを変更する

4. 測定終了操作

・Ctrl＋0 Key を押し，メインメニューに戻る
・メインメニュー内の「Shutdown the UNIX operating system」を選択する
・CPU の電源を OFF
・プロッター，インタークーラーの電源 OFF
・DSC 7 本体，TAC 7/DX，パージガスは炉が常温に戻るまで ON 状態にしておく(約 2 時間)
・DSC 7 本体，TAC 7/DXの電源を OFF，主電源 OFF 後，パージガスを止める
・エアコン OFF

§５　利用上の注意

・サンプル量は 5 mg 程度が望ましい。
・サンプルが測定温度内で爆発，燃焼しないことをあらかじめ確認しておくこと。
・サンプルが DSC の炉内にこぼれた場合は適当な溶媒で浸したキムワイプ等で拭き取ること。
・パージガス (N_2) がきれた場合は担当者に連絡すること (常時 2 本設置)。
・測定用セルは原則として、各研究室で準備すること。
・使用後は備え付けの ” 使用記録簿 ” に利用した日時、利用者名、所属する研究室名、利用時間を記入すること。

§６　応用例

抗生物質クロラムフェニコールパルミテート（CPP）は結晶多形を有する代表的な薬物であり（安定形 Form A、準安定形 Form B, Forms subB, C, D など）、溶解性が大きい準安定形結晶の含量が多いほど経口投与時の血中濃度は増大する。CPP を加熱溶融した試料の結晶化あるいは多形転移挙動を DSC を用いて追跡した結果を図４に示す。図４A は DSCセル中で 100 ℃ で加熱溶融した CPP を様々な速度で冷却した場合の DSC 曲線

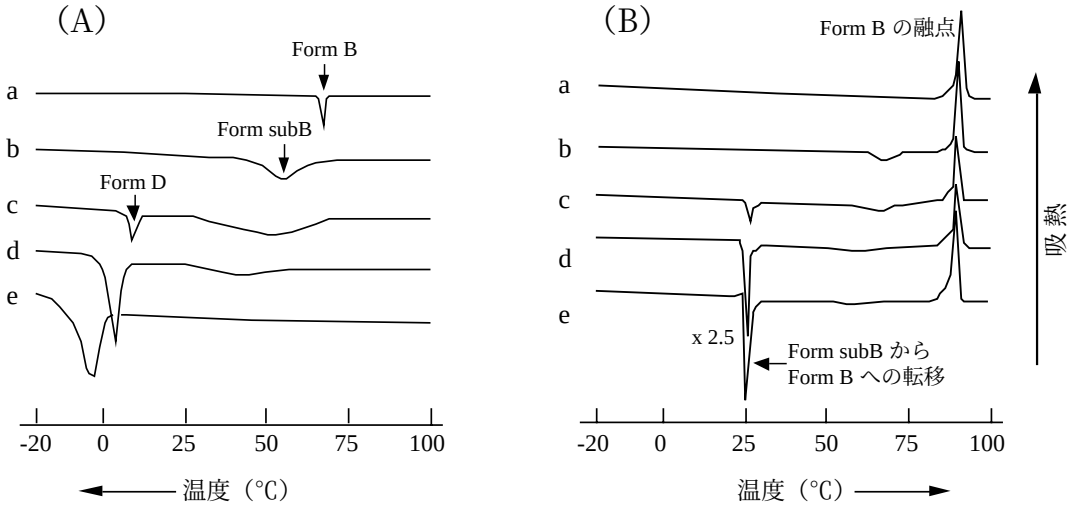


図４．クロラムフェニコールパルミテートのＤＳＣ曲線

a: 1℃/min, b: 10℃/min, c: 20℃/min, d: 40℃/min, e: 80℃/min.

を示し、図４B はそれらの試料を一定速度（10 ℃/min）で再度加熱した場合の DSC 曲線を示す。CPP の溶融体を 1 ℃/min の速度で冷却すると 67 ℃ に発熱ピークが観察され、この試料を再度加熱すると 88 ℃ に Form B に由来する吸熱ピークを与えることから、67 ℃ の発熱ピークは溶融体から Form B への結晶化に起因することがわかる。一方、10 ℃/min で冷却すると 55 ℃ に発熱ピークが観察され、この試料を再度加熱すると 60 ℃ 付近に発熱ピーク、88 ℃ に吸熱ピークを与える。この昇温 DSC 曲線は Form subB のそれと一致することから、55 ℃ の発熱ピークは溶融体から Form subB への結晶化に由来することがわかる。冷却速度を 20～40 ℃ に増大すると、Form subB の結晶化の発熱ピークに加えて 10 ℃ 付近に大きな発熱ピークが観察される。この試料を再度加熱すると 25 ℃ 付近に鋭い発熱ピークが出現するとともに、Form subB から Form B への転移、 Form B の融解に基づく発熱ピークを示す。したがって、CPP 溶融体を急速冷却するとForm D が生成し、Form D は加熱により Form subB を経由して Form B へ多形転移することがわかる。

DSC ピークを定量的に解析することにより反応速度（k）、反応次数（n）、活性化エネルギー（Ea）を求めることができる。例えば、CPP の Form subB → Form B の 55 ℃ 付近の発熱ピーク（図５）を式１で解析し、n= 0～3 を仮定した場合のアーレニウスプロットを図６に示す。式１において、dH / dt は各温度 Ti における基線からの高さ、

$$k_i = 1 / [\Delta H_{total} (\Delta H_{rest} / \Delta H_{total})^n] \cdot dH / dt \qquad \text{Eq. 1}$$

ΔH_{total} は全発熱量、ΔH_{rest} は Ti 以上における発熱量を表す。図６において n= 1 が最も良好な直線を与えることから、Form subB から Form B への転移は１次速度に従って進行し、転移の活性化エネルギーは直線の傾きから368 kJ/mol と算出される。このように、DSC 曲線の解析から固体の状態変化や熱変化を推察することができる。

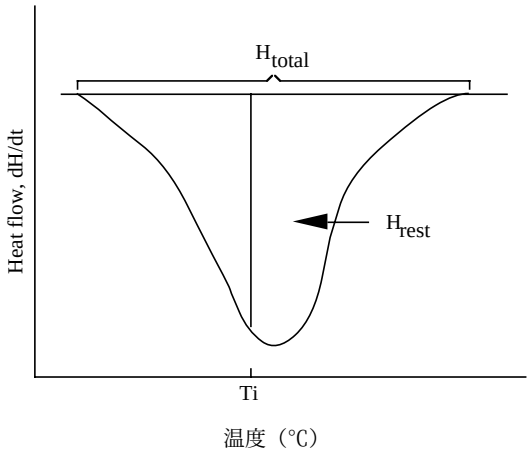


図５．Form subB から Form B の転移ピーク

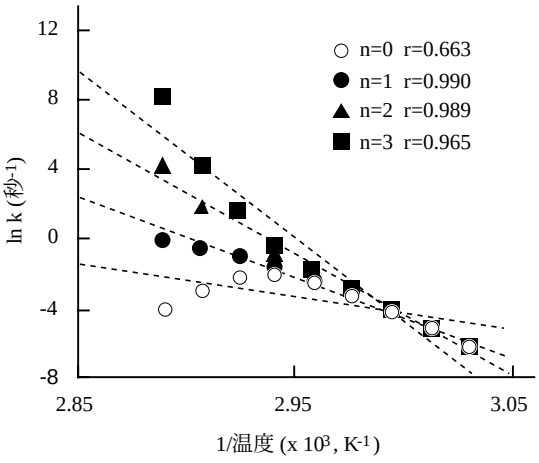


図６．Form subB から Form B の転移のアーレニウスプロット

断熱型示差走査熱量測定装置
(Microcal MC 2)

薬学部　製剤学研究室　平山文俊；内線 4161

§１　はじめに

示差走査熱量測定（DSC）は、温度の上昇・下降の過程で起こる物質の熱量変化を測定する方法であり、非断熱型と断熱型 DSC がある。一般に DSC とよばれる装置は非断熱型であり、主に固体の熱変化を測定する際に用いられる（例えば、本センターに設置されているパーキンエルマー社製 DSC 7）。一方、断熱型 DSC は希薄な水溶液中の溶質物質の熱容量を測定する目的で開発された装置であり、断熱温度制御機構を有するため、真の熱容量を高感度に測定することができる。例えば、断熱型 DSC による熱容量測定を通して、タンパク質や核酸の熱変性あるいは熱安定性、生体膜の液晶転移などの相変化の過程、薬物と生体膜との相互作用などに関する熱力学的情報を得ることができる。本センターには、J.F. Brandts の設計による断熱型 DSC （Microcal MC 2）が設置されている。

§２　原理

Microcal MC 2 の基本構成の概略を図１に示す。試料セルと参照セルは固定式太鼓型のタンタル製で、約 1.2 ml の内容量を有す。各セルには主ならびに補助ヒータが取り付けられており、それらを取りまくアルミ製の断熱ジャケットにも同様なヒータが設置されている。試料ならびに参照セルには、約 100 対の多点サーモパイルが取り付けられており、試料セルと参照セルの温度差を精密に測定することができる。

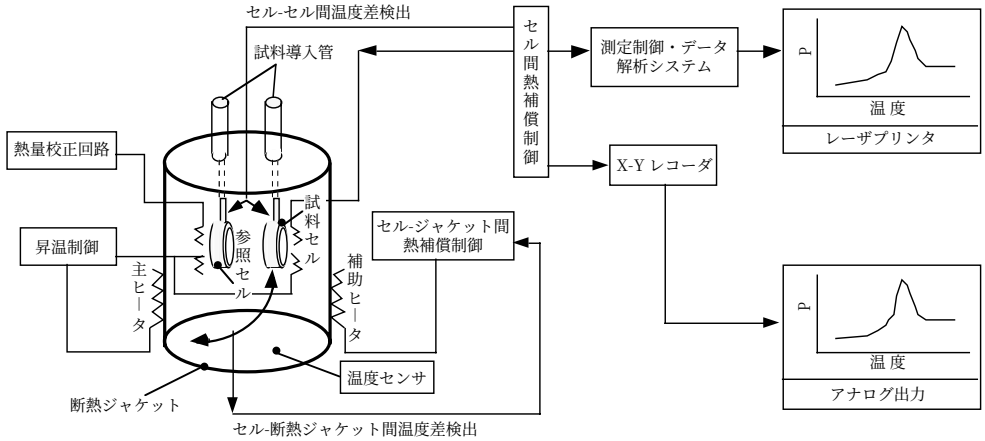


図１．Microcal MC 2 の基本構成の概略

試料溶液ならびに参照溶液を各セルにほぼ一杯になるように注入し、約 2.5 kg/cm^2 の窒素ガスを封じ完全に蓋を閉じて加熱する。試料が転移温度に到達し、吸熱が始まると試料セルと参照セルに温度差が生じる。この温度差を打ち消すように試料セル側の補助ヒータに電流を通じ、余分に流した電流は試料の吸熱量に比例する。したがって、温度の関数として熱量を測定することができる。昇温は常に断熱下で行われるため、観測された熱量は周囲との熱交換による損失を含まない正味の値となる。

§３　仕様

機種：マイクロキャル製 MC 2
　　測定温度範囲（室温～110 ℃）
　　昇温速度（10, 20, 30, 45, 60, 90 ℃/hr）
　　試料セル（タンタル製太鼓型、1.2 ml）
　　ノイズレベル（60 ℃/hr 昇温時 0.35 μW）
　　ベースライン再現性（60 ℃/hr 昇温時 1.8 μW）
コンピュータ部：SANYO MBC-18CVD3A
データ解析ソフト：カーブの縮小・拡大、DH, DCp 測定、コンピュータフイッテング、
　　カーブのデコンボリューション、データの平滑化、ベースライン
　　差し引き、熱量校正、データ保存

§４　方法

１. 起動操作および準備

・恒温槽のスイッチを ON にする（PG が押してある状態でコンピューターと連動）
・コンピューターの電源を入れ、Command Prompt をダブルクリックする
（DOS Commandに変える）
・win と入力し（MS-windowsの起動）、Microcal Origin 続いて MICROCAL をダブルクリックする（測定用のプログラム）
・DSC1 を開き Bath Circulation（水浴と測定器が循環する）を OFF にする
・MC-2 Control Panelの TEMPERATURE SHUT OFF のダイヤルを最大温度にし、RESETボタンを押す
・JACKET PUMP を押す（湿気を除去するため；10 分程度）
・試料を脱気する（空気が入っていると熱による空気の膨張でスペクトルが 変化するため）
※試験管を固定してスターラーバーを入れ蓋をし、コックを閉めた後アスピレーターの圧力調整器のネジを閉めタイマーをセットする
止めるときはネジをゆるめた後にタイマーを止める（逆流防止）

２. 測定操作

・専用シリンジで脱気した試料をとり、ニードルをセルに差し込む
この時、ニードルの先端がセルの底から約 2 mm の位置にくるように

触れないように調節する
・試料をゆっくりとセルに注入した後、セル中の空気を追い出すためシリンジをセルに差したままゆっくりと２、３回少量の試料を出し入れする
・過剰の試料はシリンジのニードルを Filling Port のふちに合わせて吸い取る
・セルカバーを装着し、N_2 ガス加圧（2 kg/cm^2；熱をかけた時の気泡の発生を防ぐため）
・パラメーターの入力（Bath Circulation は ON にする）
・Begin Experiment で測定開始（この時、COOLING IN のライトが点灯）

３. セルの洗浄
・測定終了後、試料をセルから取り出す
・3N-HCl, SDS 洗浄液, 濃硝酸のいずれかをシリンジでセルに入れ、セルカバーを付けて窒素で加圧する
・マニュアルスキャンを行い、80～100℃で数時間放置する
（3N-HCl は 100℃ で 3 時間、SDS 洗浄液は 100℃ で一晩、濃硝酸は 80℃ で一晩）
・室温以下に冷却後、シリンジで洗浄液を取り除く
・専用装置によりセル内を精製水約 500 ml で吸引洗浄する

§５　利用上の注意

１. 測定に関する注意
・試料や緩衝液の凝固点以下にセルを冷却しないこと。
・セルを 105 ℃ 以上に加熱しないこと。
・セル内にシリンジを挿入するときはセルを傷つけないように慎重に行うこと。
・測定中は必ず JACKET PUMP のスイッチは OFF にすること（ONのまま測定するとベースラインが乱れる）。
・スキャンスピードを変更する場合はソフト上のプログラムと装置前面の昇温速度選択スイッチの数値を同じにすること。
・測定中は N_2 ガスがもれないようにセルカバーをきちんと閉めること。

２. 脱気、セル洗浄に関する注意
・脱気、セル洗浄後にアスピレーターを止めるときは圧力調整器のネジをゆるめ常圧に戻してからタイマーまたはアスピレーターの電源を止めること（逆流防止）。
・セル洗浄時には廃液フラスコの廃液をチェックしながらオーバーフローさせないようにすること。
・セルが汚れた場合や測定最終日には一晩 80 ℃ で放置した後、水で十分洗浄すること（昇温はマニュアルモードで行う）。

§６　応用例

図２は、インスリンの熱変性に伴う過剰熱容量を pH 6.8 および 2.0 のリン酸緩衝液または 30% 酢酸中で測定した結果を示す。インスリンが 6 量体あるいは高次会合体として存在する pH 6.8 リン酸緩衝液では、70 ℃付近に大きな吸熱ピークが観察される。この吸熱ピークはペプチドの熱変性に伴う熱量変化に、会合体の解離に基づく吸熱ピークが加味されたものである。一方、pH 2.0 リン酸緩衝液中では 2 量体が支配的であるため、熱変性に伴う吸熱ピーク（60 ℃付近）は低温側へシフトする。さらに、30% 酢酸溶液中ではインスリンは単量体として存在するため、単量体の熱変性に伴う熱量変化のみが 50 ℃付近にブロードな吸熱ピークとして観察される。

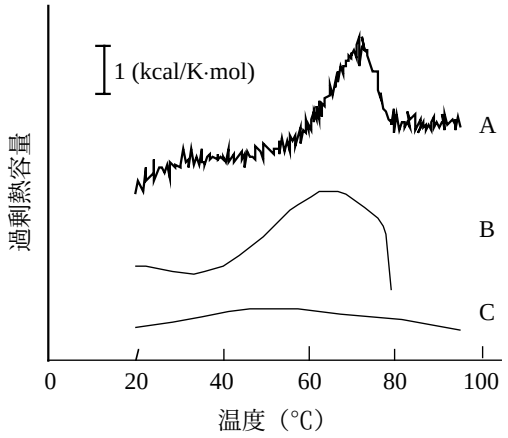


図２．インスリン溶液の過剰熱容量曲線

A: インスリン (0.1 mM), リン酸緩衝液 (pH 6.8, μ=0.2),
B: インスリン (0.3 mM), リン酸緩衝液 (pH 2.0, μ=0.2),
C: インスリン (5 mM), 30%(v/v) 酢酸溶液.

図３は、pH 6.8 リン酸緩衝液中におけるインスリンの熱的挙動に及ぼすマルトシル化 β-シクロデキストリン（G2-β-CyD）、スルホブチリル化 β-シクロデキストリン（SBE-β-CyDs、置換度 4 および 7）および硫酸化 β-シクロデキストリン（S-β-CyD）の影響を示す。G2- および SBE-β-CyDs はインスリンの熱転移温度を低温側へシフトさせる。ポリペプチド類の分子内部に埋もれていた疎水性アミノ酸が分子表面に露出すると、CyDs との相互作用が容易になって変性状態を安定化させるため、熱転移温度は低温側へシフトすることが知られている。

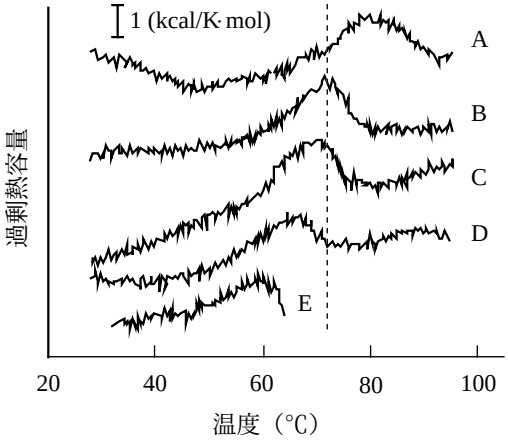


図３．インスリン溶液の過剰熱容量曲線

A: S-β-CyD, B: インスリン単独, C: SBE7-β-CyD,
D: SBE4-β-CyD, E: G2-β-CyD.

したがって、インスリンの熱転移温度の低温側へのシフトは、CyDs がインスリン会合体を解離させたことに起因するものと考えられる。一方、負電荷密度が高い S-β-CyD はインスリンの会合を促進するため、その熱転移温度を高温側へシフトさせる。このように、断熱型 DSC 曲線を解析することにより、ペプチドやタンパク質の会合状態あるいは低分子との相互作用などに基づく熱的変化を精度良く測定することができる。

走査型電子顕微鏡
（日立 S-510 形）

機器分析センター　城戸　裕；内線 4808

§１　はじめに

1932年 Brüche と Johannson により波長の短い電磁波でしかもレンズの効果が得られる電子線を利用した電界型電子顕微鏡が試作されその後， Knoll と Ruska，Ardeenne，Hillier 等の努力により電子顕微鏡が開発され実用化に至った．

電子顕微鏡には，電子ビームを試料にあてたときに出てくる電子（２次電子，X線，反射電子，陰極光，透過散乱電子，透過電子など）のどの電子を利用するかによって透過型（透過電子を利用）と走査型（２次電子を利用）の２つに大別されます．当センターに設置されている装置は走査型の日立 S-510 形です．主として試料の表面の拡大像を見るのが特徴である．

§２　原理

2-1　理論

走査電子顕微鏡（Scanning electron Microscope，SEM）では，電子鏡から出た電子ビームをコンデンサレンズで細く絞ったのち，偏向コイルで振ります（走査）．この走査電子ビームを対物レンズで焦点合わせなどを行って試料にあてると，試料表面の状態を反映した２次電子が試料から出ます．この２次電子を２次電子検出器でとらえ，２次電子の量をブラウン管の明るさに変換するとともに電子ビームの走査と，ブラウン管の走査を同期させるとCRT 上に拡大像が現れる．（Fig. 1）

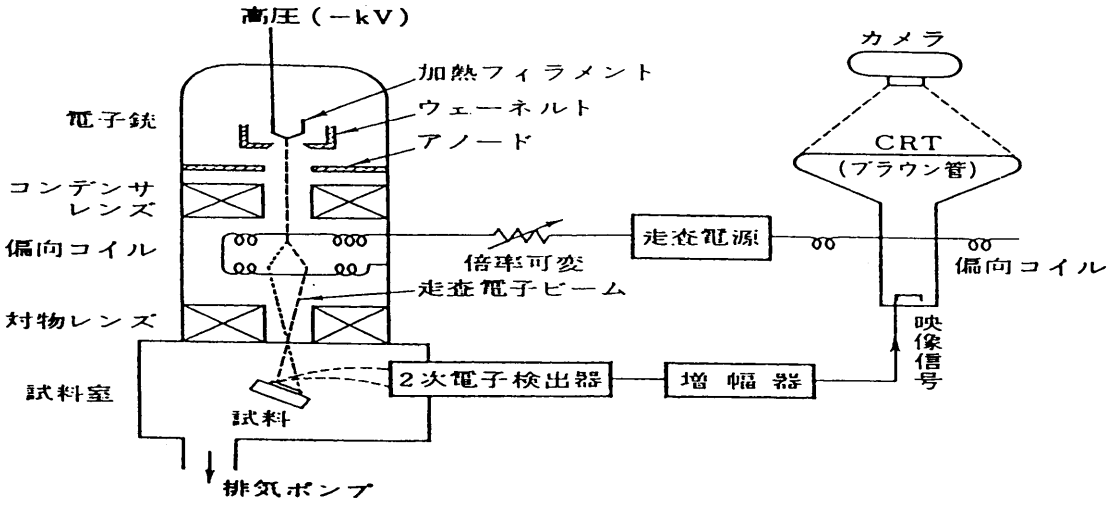


Fig. 1　SEMの原理

SEM の倍率とは，ブラウン管上の画面の幅と，試料上で電子ビームが走査される幅の比になります．SEM の特徴は焦点深度が深く（0.1～1 mm）で試料作成が比較的容易です．分解能も透過型よりやや劣るがかなりの分解能（7～2 nm）を有しております．

2 - 2　方法

（１）試料作成

① 試料の固定，洗浄，脱水を行う．
② 臨界点乾燥装置用いて試料の乾燥．
③ イオンコーターを用いて試料に金属を蒸着させる．

（２）始動操作

① 冷却水を流す．
② 電源（配電盤）スイッチ ON，EVAC POWER スイッチ ON，EVAC CONTROL パネルの EVAC スイッチを ON，HIGH ランプが点灯するまで待つ．（約20分）

（３）試料交換

① ACC VOLTAGE の OFF．
② AIR スイッチを押し，鏡体に空気を入れる．
③ 試料ステージを引き出し，試料ホルダーを取り外す．
④ 新しい試料を試料ホルダーの上にセットし銀ペーストで固定後，蒸着処理を行う．
⑤ 試料を試料台の上に取り付けたのち試料台を試料ホルダに固定する．
⑥ EVAC スイッチ ON，HIGH ランプが点灯し READY ランプが連続点灯したのち ACC VOLTAGE を ON にし像観察に移る．

（４）像観察

① HIGH ランプの点灯の確認．
② READY ランプが連続点灯後，ACC VOLTAGE の右側のスイッチを押し，加速電圧を印加する．CR
③ CRT 上の波形を調整後，像を観察．
④ 視野の選択を行う．
⑤ 倍率を設定する．
⑥ 焦点の調整を行う．

（５）写真撮影

① 視野を選択，倍率の設定，ピント合わせ，非点補正などを行う．
② カメラを CRT 上にセットし，フイルムをセットする．
③ 明るさを調整し，撮影する．

（６）停止操作

① ACC VOLTAGE を OFF，倍率を下げる．AIR スイッチ ON にし検鏡に空気を入れた後，試料を取り出す．

② STOP スイッチを ON.
EVAC POWER スイッチ OFF.

③ 約20分間待った後，電源（配電盤）スイッチ OFF.

④ 冷却水を止める．

§３　装置の仕様・付属設備

S-510 形走査電子顕微鏡の仕様及び付属設備を以下に示す．

（１）仕様

機種	：日立製作所　S-510 形	
加速電圧	：25 kV	
分解能	：7 nm（70Å）	
倍率	：4″ステージ	20 倍～150,000 倍
	60 mmφステージ	40 倍～150,000 倍
	TV モード	100 倍～150,000 倍

（２）付属設備

臨界点乾燥装置	：日立　HCP-2 形
蒸着装置	：EIKO　イオンコータ　IB-3

§４　利用上の注意事項

① きれいな像を観察するためには蒸着処理が非常に重要ですので良い真空度でゆっくりと時間をかけて蒸着して下さい．

② 試料交換，フィラメント交換のときはきれいな手袋を使用して下さい．

③ 装置に振動を与えないように注意する．

④ 試料固定用導電性ペーストを多量に使用しないようにする．

⑤ エミッション電流を流し S.E スイッチを ON にしたとき，コンデンサレンズ電流を余り少なくしないように注意する．

⑥ 大きな試料を入れ，しかもワーキングデイスタンスの短い位置で像観察を行うときは，試料傾斜角は0°付近にすること．

§５　応用例

SEM は主として試料表面の拡大像を見るのが特徴なのでいろいろな分野で利用されています．例えばラットの腎臓の糸球体やカビの胞子の応用例を Fig. 2, 3 に示します．

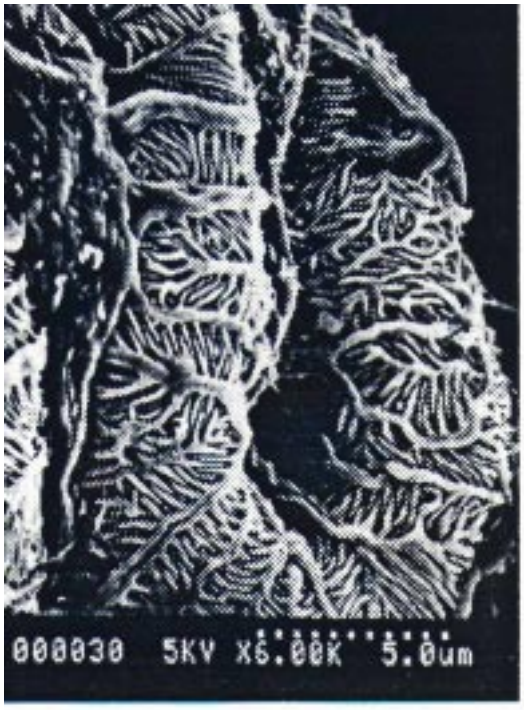


Fig. 2　試料　ラットの腎臓の糸球体

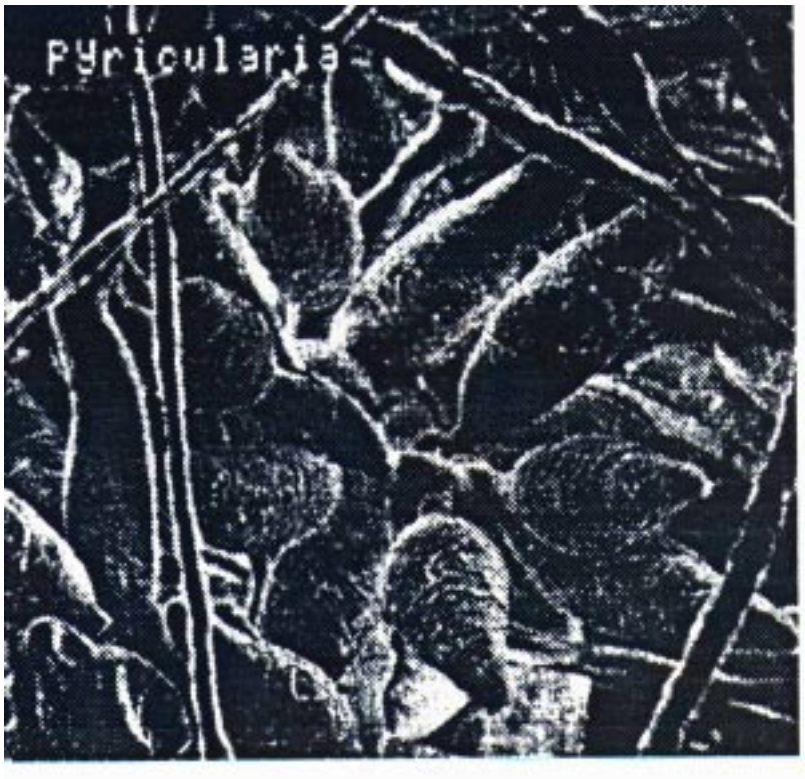


Fig. 3　カビの胞子

共焦点レーザー生物顕微鏡
（オリンパス　LSM-GB200）

薬学部　衛生化学研究室　高濱和夫；内線 4334

§１　レーザーに関する注意事項

① **レーザー光は目に有害ですので、直接見ないでください。また、皮膚に直接あてないでください。直接光はもちろん、反射光にも十分注意し、遮断を確実に**して、ご使用ください。

② スキャンユニット、及びスキャンユニットとレーザーファイバの結合部、レーザーユニットの光源部は、レーザー光にさらされるのを防ぐため、オリンパスの技術者以外は分解したり、取り外したりしないでください。

③ レーザーファイバーは極端に曲げたり、引っ張ったり、踏まないようにしてください。レーザー光が漏れ大変危険です。

④ レーザーユニット内のレーザーリモートコントローラ各操作部はむやみに触れないでください。

⑤ パワーユニットとレーザーユニットは、各々消費電力が大きいため、別々の電源系統から供給してください。

§２　使用上の注意

① 本装置は精密機器ですので、衝撃を与えないように丁寧に扱ってください。

② 直射日光、高温多湿、ほこりのある場所でのご使用は極力避けてください。
使用環境は、室温１０～３５℃、湿度３０～８０％です。

③ 振動のある場所での使用は避けてください。

④ 透過検出ユニット取付時にステージを下げすぎると、透過検出ユニットにぶつかります。ぶつかった後、更にステージを下げようとすると故障するおそれがありますので、ご注意ください。

⑤ 正立型顕微鏡（BHS）、倒立型顕微鏡（IMT-2）組合せ共に、一般の生物対物レンズを使用します。そのため、観察標本は**カバーグラス厚さ 0.17 mm**のプレパラートあるいは**底厚が 0.17 mm**のシャーレなどを使用してください。

⑥ アースは万一に備えて、必ず設置してください。

⑦ ヒューズ交換は、電源コードを抜いてから行ってください。

⑧ 各部の接続はスイッチ OFF の状態を確認してから行ってください。

§３　手入れ・保存方法

① 使用後は装置に**ほこりがかからないように適当なカバーを掛けてください**。

② 本装置は精密機器ですので、各部をむやみに分解しないでください。

③ **レンズ、フィルター類には汚れ、指紋などを絶対につけない** でください。汚れた場合には、ガーゼで軽く拭く程度にし、それでもとれない場合は、**アルコールとエーテル（３：７）**の混合液または **ベンジンをわずかに含ませて** 拭いてください。

§４　原理

走査型共焦点レーザー顕微鏡は、レーザービームを対物レンズで微小なスポットに絞り、試料上をＸ－Ｙ方向に走査します。このレーザービームの照射によって、試料から発する蛍光、あるいは透過光や反射光を検出器（スキャンユニット）でとられて画像モニター上に試料像を出力する装置です。
また、試料をおくステージを、コンピュータ連動のピエゾ装置などで、Ｘ軸方向に移動することにより、Ｘ－Ｙ方向の走査を一定時間毎に、移動したＺ軸のレベルで行うことにより、標本の３Ｄ像を得ることができます。

§５　特徴

共焦点（コンフォーカル）光学系では、図１のように合焦点位置と光学的に共役な位置（共焦点面）にピンホールをおくことにより、合焦点以外からの光を一切排除しています。従って、これらの光は、画像中においては暗黒になり、厚みのある組織標本を光学的にスライスすることができ、ここに、通常の光学顕微鏡とは異なる大きな特徴があります。通常の光学顕微鏡の場合、合焦点位置以外の光が合焦点位置の結像光と重なり、得られる像は全体的にぼやけた像になってしまいます。

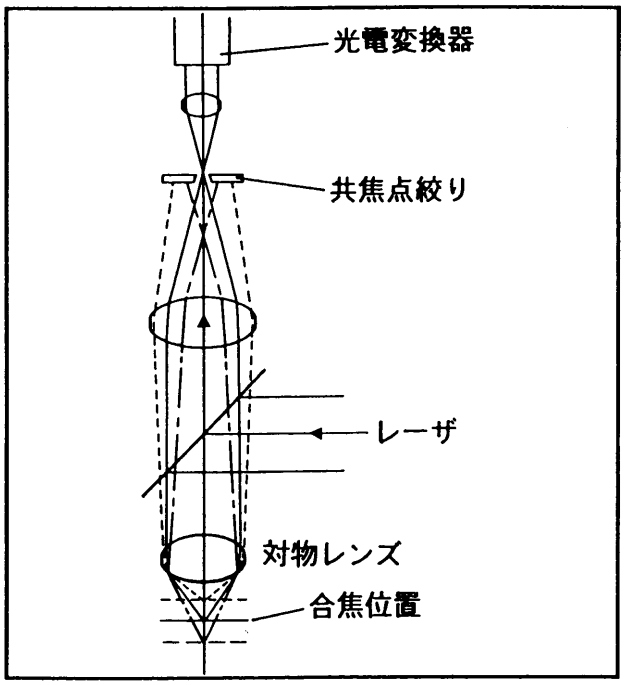


図　1

§６　用途

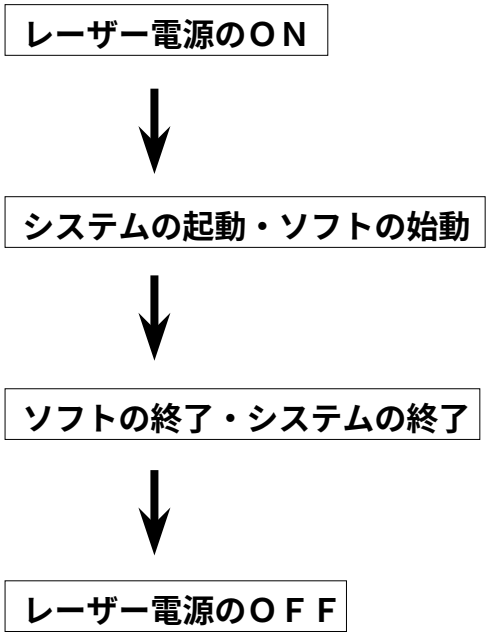
以上の原理および特徴をもつために、走査型共焦点レーザー顕微鏡は、生物系だけでなく化学系や物理系を含む様々な分野の微細形態や特定物質の動態の研究に威力を発揮します。ここでは、生物系分野の用途に的を絞って紹介しますと、以下のような用途が考えられます。

細胞内フィラメント、細胞内器官、細胞核内の核小体などの観察、
細胞膜表面や細胞内の特定の蛋白質やイオンなどの存在部位などの観察、
さらにはこれらの動態など

また、これらの観察は、単離細胞や培養細胞においてだけでなく、標本の作り方によっては、組織標本においても可能となります。
これらの観察のためには、特定の蛋白質やイオンなどに特異的に結合する抗体やその抗体と結合する**プローブが必要**ですが、最近では様々な蛍光試薬や発光試薬が市販されており、様々な実験目的に利用可能です。

§７　操作

７.１.　基本操作



7.2. 個別操作

7.2.1. レーザー電源の入れ方

注　意
- **水冷機下部の電源スイッチは常にＯＮのままにしておく。**
- **水冷機のフロントパネルのパワースイッチは常時ＯＦＦ、リモートスイッチは常時ＯＮの状態にしておく。**

レーザー電源のメインスイッチをＯＮ　（注意）

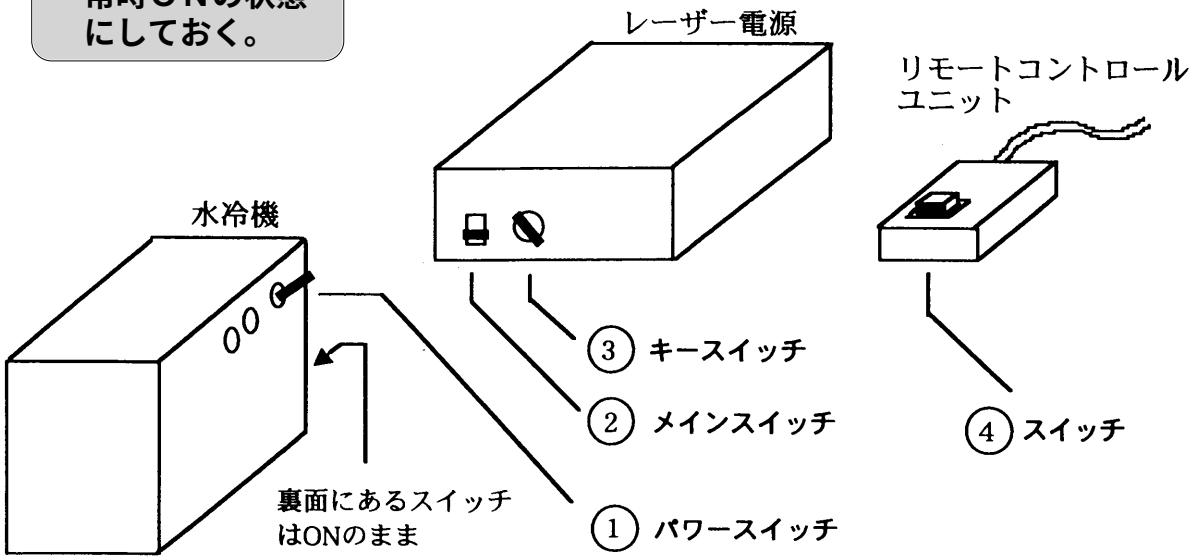
↓

レーザー電源のキースイッチをＯＮ

↓

リモートコントロールユニットのパワースイッチをＯＮ

（数10秒後にレーザーが発振）



注　意　【レーザー電源操作について】

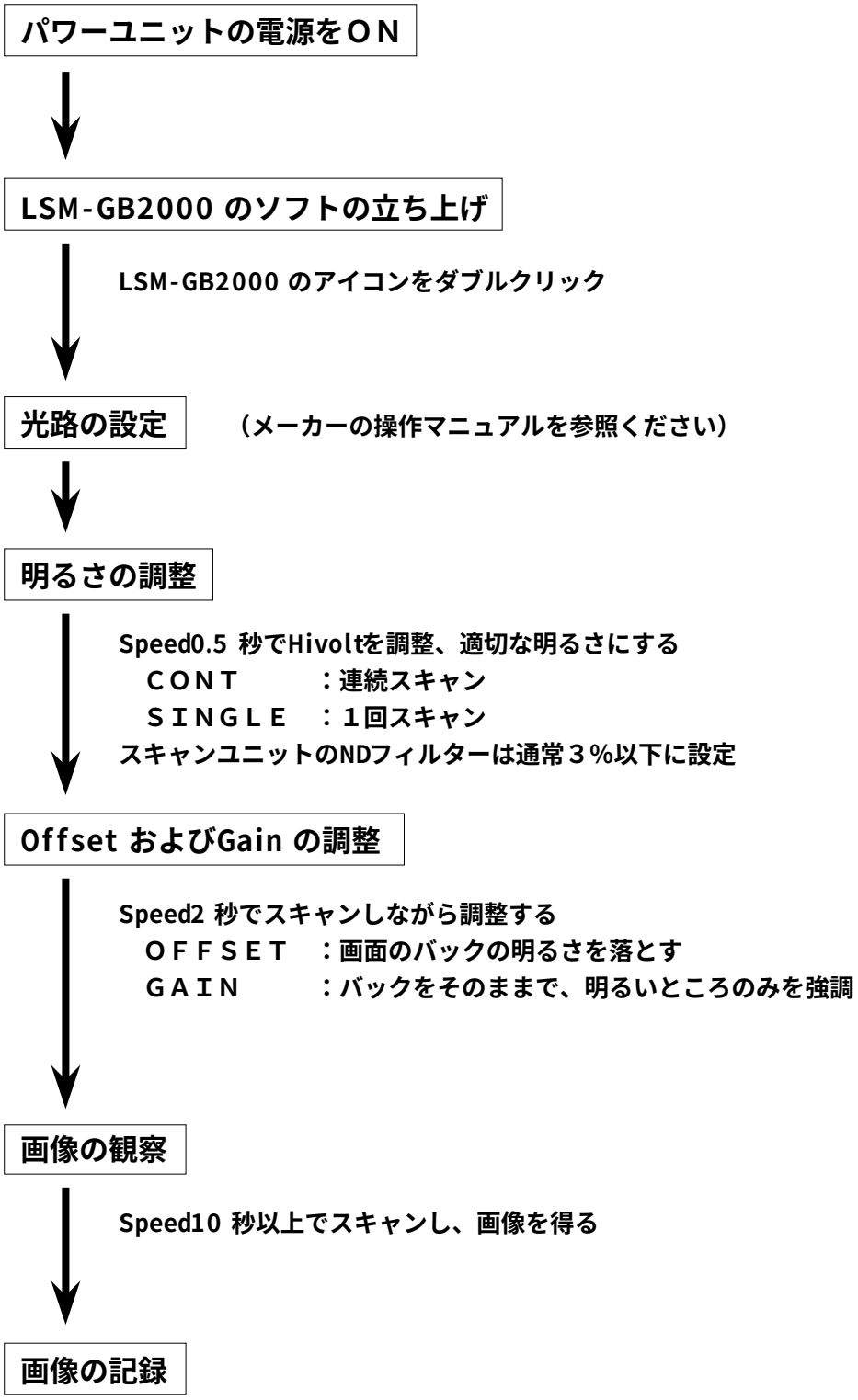
① 水冷機のスイッチは以下のように設定して操作しない。**（電源ＯＦＦ時にも）**
- **フロントパネル　Power スイッチ　ＯＦＦ**
- **リモートスイッチ　ＯＮ**
- **下部の電源スイッチ　ＯＮ**

② リモートモジュールの操作は、電源ＯＮ/ＯＦＦスイッチしか操作しない。

③ **ＵＶ出力が２５ｍＶであること**
（レーザー立ち上げ時に、２５ｍＶになるように設定してあります。
ただし、ＵＶ出力を６０ｍＶにしても特に問題はありません。）

④ レーザー発信機の上にものをのせないこと。

7.2.2. システムの起動・ソフトの始動



7.2.3. ソフトの終了・システムの終了

メニュー画面の右端のＥｘｉｔをクリック

↓

確認画面のＯＫをクリック

↓

小さなメニューが開くので、Ｓｈｕｔ ｄｏｗｎをクリック

↓

確認画面のＯＫをクリック

↓

パワーユニットの電源をＯＦＦ

↓

レーザー電源をＯＦＦ

7.2.4. レーザーの電源の消し方

リモートコントロールユニットのパワースイッチをＯＦＦ

レーザー発振キースイッチをＯＦＦ

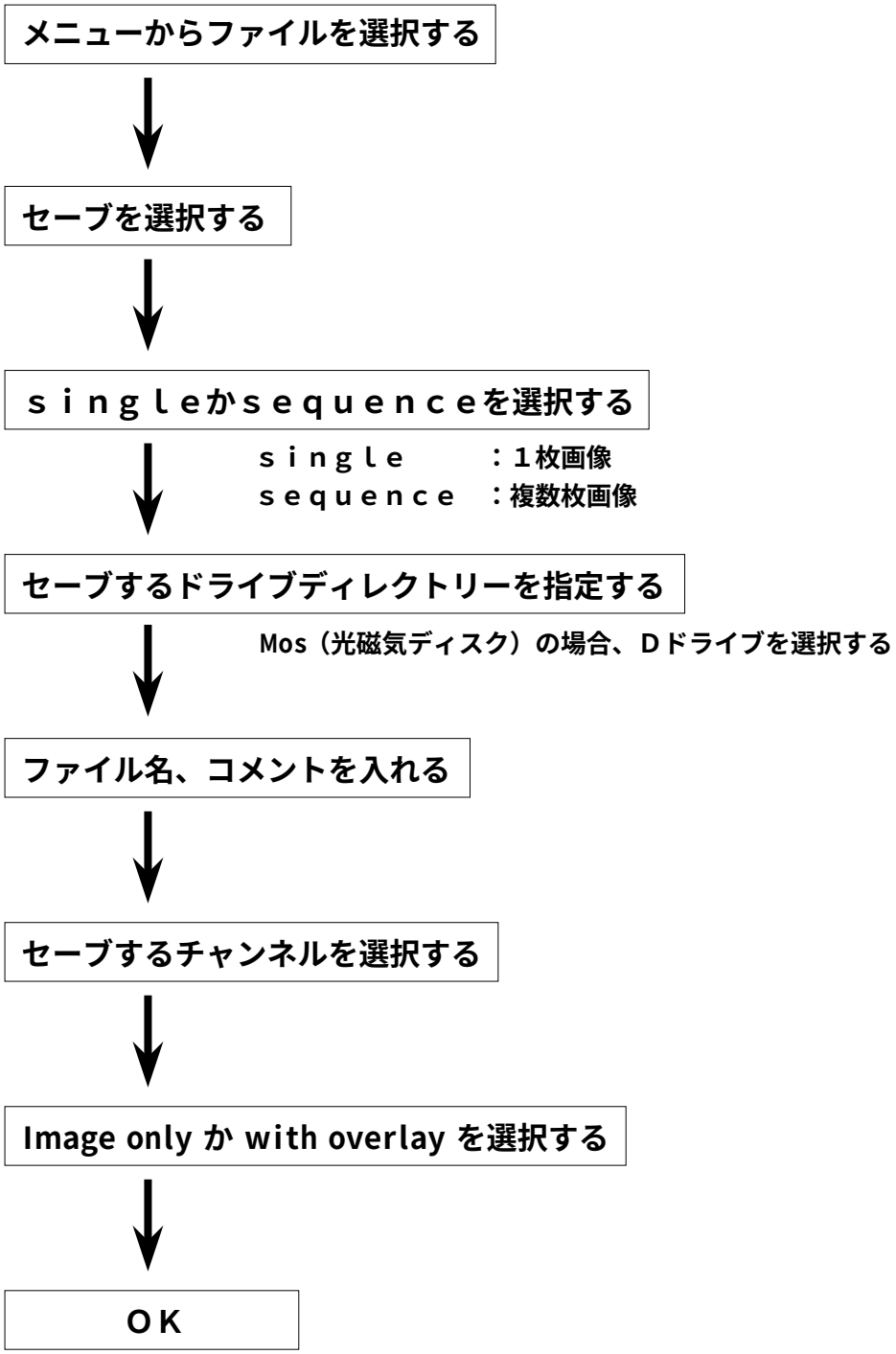
レーザー電源のメインスイッチをＯＦＦ

水冷機の水温が下がると自動的にＯＦＦになる

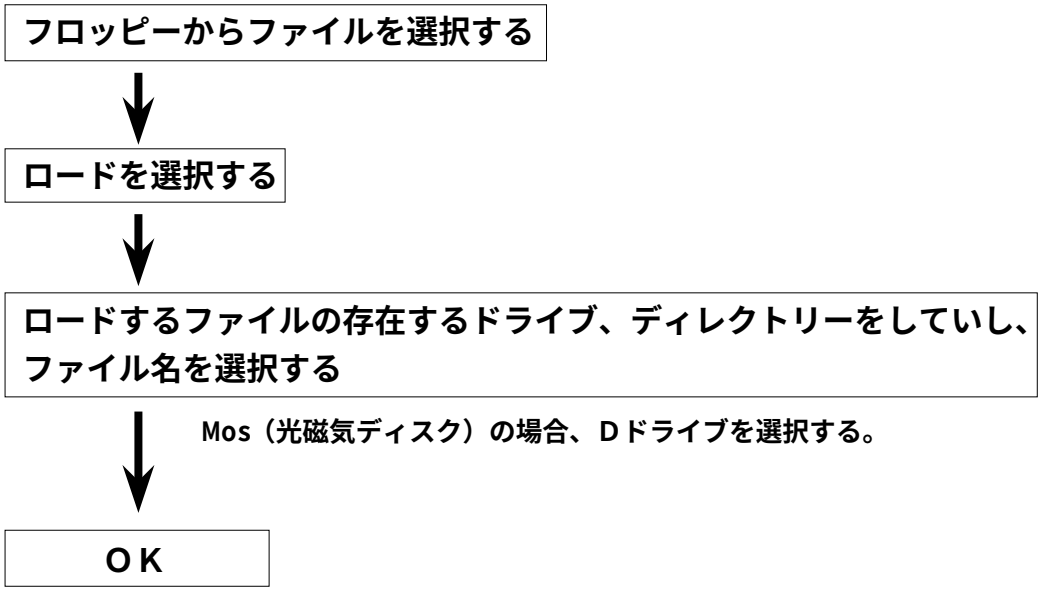
注　意
水冷機下部の電源スイッチは常にＯＮのままにしておく。

7.2.5. 画像の記録と再生

1）フロッピーへの ｓａｖｅ



2）フロッピーからのロード



注　意

1）セーブ、ロードはスキャンモードによって区別されるので、スキャンモードのチェックをする。セーブしたはずのファイルがないときは、スキャンモードを切り換えてチェックする。

2）取扱に当たっては、メーカーのオリンパスが作成した操作法のマニュアル（Instruction LSM-GB2000, Olympus ＩおよびII）を熟読すること。

3）トラブルが発生した時は、ただちに管理責任者に連絡する。

4）LSM はレーザー光を使用する高精密機器であるため、本機を最良の状態で稼働させ、永く安定した状態に保つために、部屋は空調されています。特に、夏期に空調が入らない状態で使用しない。

5）除振台に設置されていることからわかるように、振動を極力きらう機器で、本機器に振動や力が加わるとレーザーの光軸がずれたり、観察像がボケたりします。本機器に力を加えたり（物を載せるなどを含めて）、床に振動を加えるようなことをしないようにする。

画像解析装置
(FUJIX BAS1000)

薬学部　放射薬品学研究室　中山　仁；内線 4357
國安明彦；内線 4359

§１　はじめに

バイオイメージングアナライザー (BAS) は、X線フィルムのかわりにイメージングプレート (IP) を用いてオートラジオグラフィを得る装置である。IP は、電離放射線を二次元的に検出・記憶が可能な輝尽性蛍光体からなる媒体である。BAS によって露出済みのIP から画像情報を読み出し、定量および画像解析を行い、ハードコピーすることによってオートラジオグラムを得ることができる。

BAS は1987年に初めて富士写真フィルム (株) から発売されて以来、1) X線フィルムを使うオートラジオグラフィに比べ100倍以上の高感度であるため、露出時間を短縮できる、2) 放射線の量と画像の強度の関係が直線的であることから正確な定量が可能である、3) ダイナミックレンジ (量的な関係を反映して記録・再生可能な範囲) がX線フィルムに比べ、約100倍広いので強度差が大きい場合でも正確に定量できる、4) 画像データがディジタルで各種画像処理、演算、通信が容易である、5) 暗室作業なしでオートラジオグラフィが得られる、等のメリットがある。

§２　原理とシステム構成

イメージングプレート (IP) とは、ポリエステルの支持体の上に輝尽性蛍光体 ($BaFBr:Eu^{2+}$) が塗布された板である。輝尽性蛍光体は、電離放射線の照射を受けると結晶内の電子が準安定状態に励起される。ここで光照射を行うと準安定状態に励起された電子が基底状態まで落ちるが、この際、照射した光よりも短波長の輝尽性蛍光と呼ばれる光を放射する。この原理を応用したオートラジオグラフィが、ラジオルミノグラフィと呼ばれる新しい手法である。すなわちIP に放射性試料を密着させ露光させると、試料に含まれるRI の面内分布の応じて、準安定状態に励起された電子の分布が生じる。この露光後のIP 表面をレーザービームで走査すると、露光量に応じた輝尽性蛍光を発する。この光を光電子増倍管で検出し、光変換素子を用いて電気信号に変換する。露光によってIP に記録された放射線像は１画素あたり200 μｍ のディジタル画像データ (BAS1000 の場合) として読み取られ、解析部に記憶され、種々の画像解析を行うことができる。このディジタル画像データを印刷することによりオートラジオグラムが得られる。また、読取り後のIP は消去器で二次励起光の波長を含む可視光を均一に照射することにより残像の消去が可能であり、再度使用ができる。

本学分析センターのBAS1000は、BASシリーズでは一番解像度の低い初期モデルあり、主として電気泳動後の^{32}Pの検出用と位置付けられている。脳切片等のオートラジオグラフィにはやや分解能が不足するが、全身オートラジオグラフィなどの薬理学研究や分子生物学・生化学研究には十分対応できるものである。

本センターのBAS1000システムのハードウェア構成は次のようになっている。

1、読取り部：露出が終わったIPに蓄積された潜像を読み取り、ディジタル画像データとして出力する。

2、解析部：コンピュータ、ハードディスク、磁気テープ装置、光磁気ディスク装置、モニター、キーボードからなる。この解析部からシステムのほとんどの動作の指示を行う。読取り機で読み取られたディジタル画像データは、すべて一旦、ハードディスクに保存される。他に画像データを画像として表示したり、各種定量・演算を行うとともに、磁気テープや光磁気ディスクを用いての画像データの保存や呼び出しの機能を持つ。ソフトウェアはUNIXシステムである。

3、高画質プリンター(ピクトログラフィー)部：画像データを一般写真を同じ画質のハードコピーをして出力する。白黒およびカラー印画として出力可能である。

4、レーザービームプリンター(LBP)部：300 dpiの白黒画像、定量データなどを普通紙に印刷する。

5、消去器：露出前のIPに光を照射し、バックグラウンドノイズを消去する。読取り後のIPの消去にも用いる。

§３　操作方法（詳しくは取り扱い説明書を参照）

ａ）露光（暗室での操作は特に必要ない）

1、使用前には、IPを消去器にかけて自然放射線によるバックグラウンドを消去する。（§３．d) IPの消去の項を参照）

2、試料の表面を上にしてカセットに装填する。

3、IPの表面をRIで汚染させないために、サランラップ等(シワにならないように注意する)をサンプルの上に敷く。^{3}H専用IPを使用する時は用いない。

4、IPの露光面(白い面または青い面)とサンプルが合わさるようにIPをカセットに装填する。サンプルとIPがカセット内に、ぴったり納まっていることを確認する。

5、カセットのカバーを閉じて、露光を開始する。
(カチッと音がするまでしっかり閉めること、完全遮光）

ｂ） BAS1000システムの起動

注）本センターのBASシステムはUNIXである。マウスには３つのボタンがある(左：確定、実行、中：移動、右：削除)。通常、１番左のボタンを使い、クリックは一回でOK(マックと違う)。

1、LBP、メインスイッチの順に入れる。ピクトロは、使用する時でよい。

2、システムの自己診断後、モニターに [login:] が表示される。
キーボード (テン・キーは使用しない) から bas1 と入力し、リターンキーを押す。
しばらくするとデスクトップが現れる。

3、読取り部は、約１０分後に立ち上がる (フタが開いているとエラーがでる)。
操作パネルの表示部が READY Set Host For Scan となっていることを確認する。

c）イメージングプレート (IP) の読み取り

1、部屋を暗くして、読取り部のフタを開け、IP の白い部分を上にしてセットする。
^{3}H 専用は青い面を上にする。セットしたら部屋は明るくしてよい。

2、モニター画面上のImage File Manager 1.0 内の [Scanner] にマウスのカーソル ↑ をあて、左ボタンを押す（左クリックする）。

3、画面上にIP Scanner Controller と表示された大きな枠が出てきたら、マウスを動かして [Image File Name (Type in)] と表示されている付近に移動する。
▲ が点灯していることを確認する。

4、画像ファイル名をキーボードから入力し、リターンキーを押す。
アルファベット、数字、＿ (アンダースコア) 以外使えない。１４文字まで有効。
例、980101yakugaku　（日付と使用者名など）

注）カレントディレクトリーにすでにあるファイル名と同じ名前をつけると、元のファイルに上書きされる（元のファイルが消える）ので注意する。

5、[Comment] と表示されている付近に移動したら、画像ファイル名と同様にサンプル名、実験条件、露光時間などのコメントをキーボードから入力し、リターンキーを押す。使用文字種の制約はない。例、 BSA&HSA/western/12 h

6、 [Set] を左クリックし、続いて [Scan] を左クリックする。

7、読取り部の操作パネルのSTARTボタンを押すと読取りが始まり、操作パネルの表示が SCANNING Completed と表示されたら読取り完了 (約５分)。

8、IP Scanner Controller 内の [Quit] をマウスで左クリックする。続いて[yes] を選択し、ウィンドウを閉じる。

9、読取り部からIP を取出し、消去器にかける。（§３．d) IP の消去の項を参照）

d）IP の消去

1、消去器の背面右側にある電源スイッチをON にする。緑色ランプが点灯する。

2、トレイを引きだし、露光面 (白または青)を上向きにしてIP をセットする。

３、トレイを元の位置まで押し込み、全面パネルにあるSTARTボタンを押す。
内部の蛍光灯が点灯し、消去が始まる。内蔵タイマーは４０分に設定されている。

４、蛍光灯が消えたら消去終了。

５、トレイを引き出し、IP を取り出し、消去器の電源をOFF にする。

６、解析の際、モニターにoverexposure と表示された場合、消去を繰り返す。

ｅ）画像の解析（詳しくは取り扱い説明書を参照）

１、解析したいFile Nameの上をマウスで左クリックし、反転させる。

２、[Image__Analyze] を左クリックすると、数秒後に画像ウィンドウが出てくる。

３、画面ウィンドウ上部にあるコマンドボタンで解析する。

・Color; カラー表示の切り替え
・Enhance; 濃度変換（階調を変えることで見やすい画像にする）
Gradation Bar の使い方
1) 片方の縦バーにマウスカーソルを合わせ、左ドラッグで移動させる。
2) もう一方のバーも同様に移動させる。
3) 目的の位置 (値) が決まったら、実行をクリック。
・Radioactive; 放射線量計測
・Molecular; 分子量計測
・Profile; 放射線強度のグラフ化
・Print; プリントアウト（LBP、ピクトロでプリントする）
ピクトロで出力する場合は４Ｘで実寸大にプリントされる。
LBP でTrim で出力する場合、約１０分後に印刷されてくる。
Trim では、枠で囲んだ部分のみが印刷される。
・Superimpose; 画面に矢印、文字を入れる。（Trimでは、印刷されない）
・Magnify; 拡大表示（画像を大きくする）
・Quit; 終了

４、[Quit] を左クリックして絵を画面から消して終了する。
注、プリントが完了してから行う。

ｆ）データの保存・読み出し

１、光磁気ディスク (MO) を使用する面を上にしてセットする。

２、画面の [MO] をマウスで左クリックする。

３、初めて使用するメディアは初期化 (イニシャライズ) を行う。
MOコントローラ画面上の [Initialize] を左クリックし、システムの質問には全て、リターンキー (キーボード) を押していく。約２０分で片面終了。

４、[Mount] を左クリックし、 You can access MO disk を確認する。

５、データを保存する場合、名前をマウスで反転させ、[Copy] を左クリックする。
mo をキーボードで入力し、リターンキーを押す。

６、データを読み出す場合、ディレクトリ moをマウスで反転させ、 [Change Dir] を左クリックして、カレントディレクトリ [/bas1000/image/mo] にする。名前をマウスで反転させ [Image__Analyze] を左クリックする。

７、ディスクの取り出しは、MO コントローラー画面上の [Un Mount] を左クリックし、続いて[Quit] を左クリックし終了する。

g）システムの終了

注）レーザービームプリンターのランプが点滅していないか確認する。印刷が終了するまでは、絶対コンピュータを終了しないこと。

１、Image File Manager の枠内の [Quit] をマウスで左クリックする。

２、[yes] を左クリックする。

３、しばらくして [login;] が表示されたら、halt をキーボードより入力し、リターンキーを押す。

４、画面上に [Halted] が表示され、 [>] マークが出るのを待つ。

５、表示を確認し、全ての電源を落とす。

h）よくあるトラブル

・LBP で出力した際、変な数字が出てきて印刷がうまくできない。

原因；プリンター出力している途中で、UNIXを閉じたり、コンピュータの電源を切った場合、次に立ち上げて使う時、正常にプリントアウトされない。

以下のようにして復帰させる。

１、Image File Manager 1.0 上の[Unix] を左クリックして開く
２、lpq とキーボードから入力し、リターンキーを押す。
３、表示を見る。何かはいっているはず。no entry ならば何も入っていない。
４、lprm_-（lprm ｽﾍﾟｰｽ -）と入力し、リターンキーを押す。
５、lpq と入力し、no entry の表示を確認後、Control とD を同時に押してUNIXを終了する。

§４　BAS1000の仕様

有効画像サイズ：一般用 200 X 400 mm
画素サイズ：200 μm
Gradation：256 (8 bit)
ラティテュード, L：4

感度, S：10,000
コンピュータ：SUNワークステーション（UNIXシステム）
ピクトログラフィ：ピクトログラフィ2100

§５　利用する方へ

１、IPとカセットおよび光磁気ディスクは各教室で購入してください。

・IP (水に濡れないように注意する、また^{3}H 用の表面には絶対触れない)
　BAS-IIIS2040：一般用 (^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{99m}Tc, ^{125}Iなど)
　BAS-TR2040S：^{3}H 専用
・カセット
　BASカセッテ2024
・光磁気ディスク
　ROD-5064F（リコー製）

２、使用ノートに必ず記入してください。
日付、名前、研究室名、使用時間数、解析件数、プリンター使用枚数。
また、各研究室ごとに総使用時間も計算して記入してください。
なお、ピクトログラフィーの枚数は、正確に記入してください。

３、ピクトログラフィーのフィルムおよびペーパーの装着は、管理者がします。
内線4359まで連絡お願いします。

４、データは光ディスクで保存し、なるべくデスクトップ上に残さないでください。
ハードディスクの空き容量が少ないとデータを取り込めません（最低 2 MB)。

ピコ秒蛍光寿命測定装置
（浜松ホトニクス）

薬学部　薬剤学研究室　今井輝子；内線 4153

§１　はじめに

蛍光分子が光を吸収すると、その電子は励起状態に遷移し、その後、分子内緩和過程を経て、第１励起状態の最低次の振動レベルまで落ちる。この第１励起状態の最低次の振動レベルから基底状態に落ちる過程には、発光過程と無輻射過程の２つの確率過程が競合する。この２つの過程の速度定数の和の逆数が蛍光寿命であり、通常、10^{-9}sec以上である。量子収率は速度定数の（単なる）比にすぎないが、量子収率と一緒に蛍光寿命がわかれば、速度定数の絶対値についての情報が得られ、光化学と光物理を合理的に解釈することができる。

最も単純な蛍光強度はただ１つの蛍光寿命τで表されるが、２相性の減衰曲線で表される場合には、蛍光寿命がτ_1とτ_2の２つの成分が混じっているものと解釈される。このように蛍光寿命が２成分を示す原因は、化学的性質の異なった２種の蛍光分子が存在する場合が多いが、必ずしもそういう場合に限らず、たとえ化学的には１種類の蛍光分子を用いても、蛍光減衰曲線は２成分を示すことがある。例えば、トリプトファン分子の場合は２つのコンフォーマーの存在で説明される。また、蛋白分子の蛍光ラベルなどでは単一のプローブを用いても、結合部位が異なる場合や、結合部位が１箇所でもそのまわりの局所構造に異性体が存在する場合がある。さらに、アロステリックな蛋白分子では２つの分子状態が異なった蛍光寿命を与える可能性がある。

蛍光寿命の測定には、非常に短い時間しか存在しない光励起状態の変化過程をナノ秒、ピコ秒の時間分解能でとらえる測定法が必要である。これまで、位相変調法、パルスサンプリング法、時間相関単一光子計数法、励起プローブ法などが開発されてきた。本機種はパルスサンプリング法によるものであり、ピコ秒モードロック固体レーザーを励起光源に、蛍光検出にストリークスコープを用い、5psの高時間分解能を持つものである。

§２　ストリーク法の原理

ストリークスコープの動作原理を図１に示す。半導体レーザーピコ秒光源から、光電面上に入射した蛍光パルスは光子数に比例した数の光電子に変換され、その後、加速電極により加速される。一対の偏光電極の間を光電子が通過する瞬間に、高速掃引電圧を偏光板に印加して、光電子の軌道を上から下へ掃引する。掃引された光電子はマイクロチャンネルプレートにより電子増倍されて蛍光面で光学像に変換される。この光学像をストリーク像とよび、時間軸を空間軸に変換することによって、光子が光電面に到達した時刻とその強度とをストリーク像の位置及び輝度から知ることができる。さらに、光

電面上の水平方向の位置情報は、ストリーク像の横軸方向に保存されているので、分光器による分光像を光電面上に結像し、ストリーク掃引を行うことにより、縦軸が時間軸、横軸が波長軸、輝度が蛍光の強度に比例するストリーク像を得る。得られたストリーク像はそのまま画像積算するアナログ積算法、あるいは信号とノイズをしきい値により分離して信号のみを積算するフォトカウンティング法の２通りで積算して、CCDカメラにより読み出される。

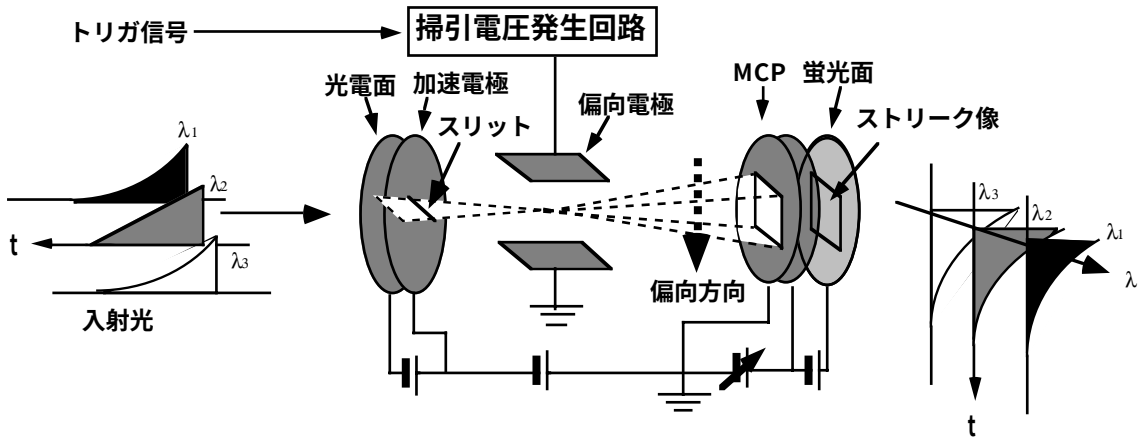


図１．ストリークスコープの動作原理

§３　ピコ秒蛍光寿命測定装置構成リスト

ピコ秒蛍光寿命測定装は以下のA～Eの部分から構成され、図２に示すように連結されている。

A. 励起光源部

窒素レーザー（NN-100）
色素レーザー（DL-50）
半導体レーザー（C4725-01）

B. タイミング調整部

光トリガユニット（C4729）
注：窒素/色素レーザー使用時のみ
シンクロナスジェネレーター（C4792-01）
注：窒素/色素レーザー使用時……EXTモード
半導体レーザー使用時……INTモード

C. 検出装置部

分光器＋電源（C5094S）
ストリークスコープ＋電源コントローラー（C4334-01）

D. 光学系部

2分岐ファイバー＋ファイバー光学系（A5760）

半導体レーザー用集光光学系（サービス品）

E. データ解析部

MAC本体＋モニター＋キーボード＋GPIBボード＋ビデオカード＋プリンター

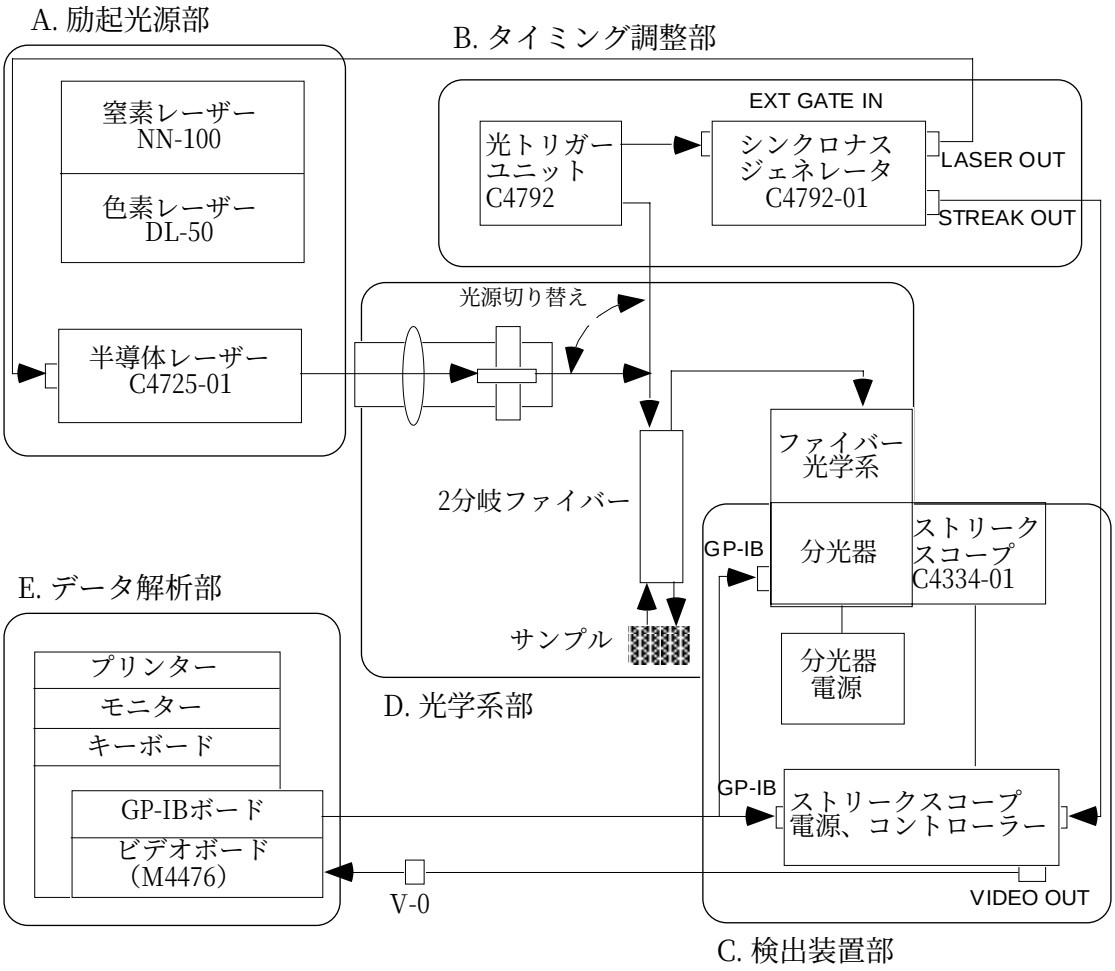


図２.ピコ秒蛍光寿命測定装置チャート図

§４　操作手順

1. Aを除く全ての電源を投入する。
2. 30秒待機
3. マッキントッシュの電源を投入する。
4. アプリケーションソフトを起動する。
5. 表示に従って、初期メニューへ。
6. SCALEを開き、TIME SCALEは、C4792のファイバー長で使用可能なレンジ（1-10nsまたは20-200ns）に設定する。

7. SCALEを開き、WAVE LENGTHの中心波長を現在使用中のレーザー波長に設定する。
8. ACQUISITIONを開き、MONITOR ON にする。
9. Aのレーザー類を発振させます。
10. 2分岐ファイバープローブ出口にレーザー光が来ていることを確認する。
11. 名刺又はサンプルをプローブ下に置く。（この際、2-3mmの距離をサンプル登ファーバー出口との間に保つと適当。）
    ＊決して、サンプルと接触させたり、サンプル溶液の中に浸けたりしないこと。
12. 分光器に取り付けられているノブを回し、スリットを広げる。（ノブが下に降りる方がスリットが広がる方向）
13. ファイバー光学系のカラーフィルター、NDフィルターの位置は"○"の位置に設定する。（この場合、双方ただのガラスの状態です）
14. ACQUISITIONに戻って、MAC-GAINが"1"であることを確認する。
15. Bのシンクロナスジェネレーターの"DEL"の値を現在使用中の時レンジ（x ns-ms）に合わせて調製する。
16. ACQUISITIONに戻ってMCPをONにする。
17. 画面が赤く飽和しない程度にMCP GAINを上げる。（この際、最高に上げるのが良い）
    ＊ただし、決して画面が赤い状態にはしないこと。もしなったら、すぐ、MCPをOFFにするかMCP GAINを1まで下げる。その後、スリットを絞ったりしてっこの様な状態にならない様に調節する。この赤い状態を続けるとストリークカメラが不可逆的に焼けて壊れ、1000万円近い損害となります。
18. ストリークカメラのレーザーの画面上のイメージをPhoton Counting条件（＜1 count/sec/channel）の光量に設定して取る。
    ＊これをきちんと設定してデータを取らないと誤ったデータを取ることになります。
19. サンプルの蛍光波長にSCALEのWAVE LENGTHを設定する。
20. ファイバー光学系のカラーフィルター（CF）、NDフィルター（ND）は"○"の状態に戻す。
21. モニター画面上（MONITOR　ON. MCP ON）になにかしら輝点が確認できたら、適当な回数で（BINARYZATION）だ蛍光イメージの発光時間幅（画面縦方向で1/3位の発光）とPhoton counting光量を確認する。
22. LASER（レーザー光イメージ）とDECAY（蛍光イメージ）を積算しセーブする。
23. 測定したい波長帯へVertical Window をかけ、ANALYSE内LIFE TIMEグラフ上へ、LASER及びDECAYで、それぞれ、レーザー光及び蛍光プロファイルをロードする。
24. プレフィッティング処理（注：システムマニュアル参照）を施した後、フィッティング（FITTING）する。
    ＊CAI（一般にいうCHI SQUAREのこと）の値が、小さくなるように、成分を2成分に変更したり3成分に変更したりします。

25. 寿命の大きく異なる、成分が混在する場合は、狭い時間窓（1-5ns）で（100-900ps）のDECAYのτ1を求めておく。
26. 広い時間窓に設定して（Photon Countingの時間窓注意）、遅い成分の解析を行う。（ただし、この時、τ1の値は前述で求めた値にFIXED（固定して下さい）
27. LIFE TIMEのグラフをセーブする。
28. プリントアウトする。

§５　応用例

SH基に対する特異的な蛍光試薬であるアクリロダンをヒト血清アルブミン（HSA）に共有結合させた時の蛍光寿命の測定例を紹介する。図３にストリーク像を示す。

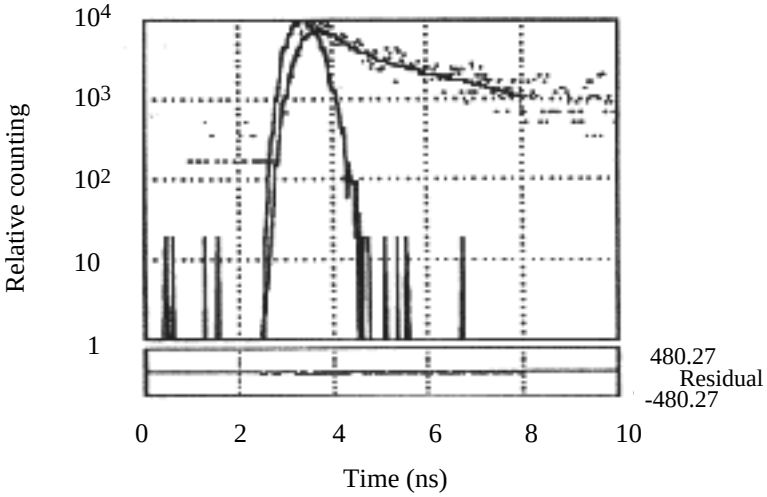


図３　HSA-アクリロダン結合体の蛍光寿命

pH 7.4　100mMトリスーHCl緩衝液
励起パルス：窒素レーザー337.1nm
　　窒素励起色素レーザー420nm
繰り返し周波数：10kHz
蛍光波長：470nm
シングルフォトンカウンティング法
　入射光スリット幅：100μm、
　積算：10ns/480chnnel

蛍光寿命の解析は２成分系の分解式に従って算出した。その結果、HSA-アクリロダン結合体の蛍光は蛍光寿命0.5ns以下の非常に速い成分と3.05secの蛍光寿命を持つ遅い成分とからなっていることが明らかとなり、それぞれ22%と78%の寄与をしていることが示された。

アクリロダン単独も蛍光寿命は２成分系のにフィットすることが知られているが、ここで示したように、アクリロダンは蛋白と結合した場合にも、その存在状態に異なる２種類の状態があるものと推察された。また、この蛍光寿命はオレイン酸の添加により、短縮されることが示され、HSAにオレイン酸が結合することで、アクリロダン結合部位周辺の構造に自由度が増すような変化が生じることが明らかとなった。

（R. Narasaki, T. Maruyama, M.Otagiri, Biochim. Biophys. Acta 1338, 275-281, (1997)）

円二色性分散計
（日本分光 J-720）

薬学部　薬剤学研究室　今井輝子；内線 4153

§１　はじめに

1817年Biotは種々の天然物に旋光性のあることを見出し、その旋光角は測定光の波長によって変化するという旋光分散（optical rortatory dispersion: ORD)の現象を発見した。その後、測定波長領域で光を吸収しない物質では短波長になると、一般に旋光度の絶対値が増加し、光吸収する物質ではその吸収帯の近くの波長領域で、旋光度の値が一つまたは二つ以上の極大と極小をそれぞれ示すこと（コットン効果）が判明した。しかしながら、測定上の問題のため、ほとんど応用されることがなく、光電子増倍管を用いた光電子分光偏光計が1955年、H.Rudolphによって完成されてはじめて、旋光分散および円二色性の測定技術が急速に進歩し、分子の絶対配置、配座解析および反応速度などの研究に有力な手段として応用されるようになった。現在では170-1000nmの波長領域での測定が可能となり、旋光分散、円二色性（circular dichroism: CD）、温度変化、磁気旋光分散、磁気円二色性の測定も容易になっている。

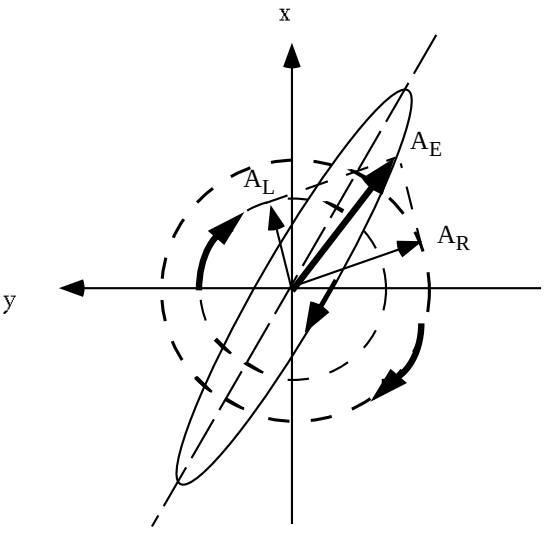


図１．円二色性による楕円偏光の生成

§２　原理

２．２　理論

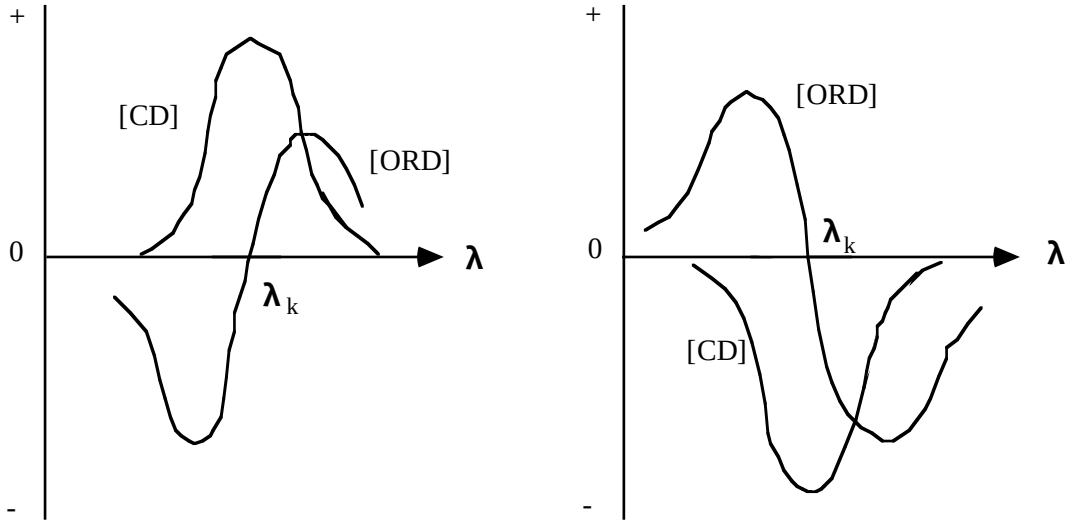
平面偏光は左巻きおよび右巻きの円偏光からなっており、この両成分が媒体を通過する速度が等しければ旋光度は測定されない。しかし、左と右円偏光に対するある波長での媒体の屈折率が異なれば、両成分は異なった速度で媒体を通過する。したがって、左および右の円偏光が媒体を通過して再び一緒になった時には、位相に「ずれ」を生じることになり、透過光の偏光面は回転させられたことになる。さらに、左右の円偏光が異なった割合で媒体に吸収されると、透過光は図１のように楕円偏光となる。この不等吸収の現象が円二色性（CD）と呼ばれる。吸収の度合いの相違と左右円偏光の透過速度とが重なって同時に起こるのが、コットン効果（cotton effect）である。円二色性は楕円性θによって表される。ただし、θは楕円の短軸と長軸の関係を表した

ので、 $\tan\theta = A_L - A_R / A_L + A_R$である。一般に、左右円偏光の吸収係数の差は極めて小さく、平面偏光からのずれは小さいので、この効果が問題となるのは、吸収帯の付近においてである。左右円偏光に対する分子吸光係数（ε_R、 ε_L）と分子楕円率［θ］とは次の関係がある。

［θ］＝θ・180／π・10・M／c　3300（$\varepsilon_L - \varepsilon_R$）＝3300・Δε

Mは分子量、cは濃度（g/mL）である。$\varepsilon_L - \varepsilon_R > 0$のときは右楕円偏光で分子楕円率は正の値を持ち、$\varepsilon_L - \varepsilon_R < 0$のときは左楕円偏光となって分子楕円率は負の値を持つと定義する。

ORDとCDの関係は図２に示すように、CDの極大及び極小の波長はUVの極大にほぼ一致し、旋光分散の極大と極小の波長の間にある。また、その符号はコットン効果の符号と一致する。すなわち、ORDにおいて、短波長に行くにつれて最初に極大が現れるものを正のコットン効果曲線、極小が現れるものを負のコットン効果曲線という。



(a)正Cotton効果　　(b)負Cotton効果

図２．旋光分散（ORD）と円二色性スペクトル

２．２　測定方法とデータ整理の方法

[測定する前に・・・]

1. 冷却用水を流す。（蛇口をひねると本体のほうで音がカチッとするのでそれよりさらに45度ぐらい回す。）
2. 窒素ガスを流す。（通常の測定では2L / min、測定波長が180～200nmのときは10L / min、170～180nmのときは、50L / minで流す。流量計で確認すること。）
3. 本体のPower 1をONにする。（このとき電流が25Aになっていることを確認すること。つまみで調節する。）
4. パソコンの電源を入れる。
5. 本体のPower 2をONにする。
6. パソコンにシステムディスクを挿入する。

7. 日時を入力すると、本体の準備ができているかどうか聞いてくるので、できていればONのほうでリターンキーを押す。（データ整理のみの時は、OFFでリターンキーを押す。）
8. イニシャライズに5分ほど要する。
9. 何かキーを押すとメインメニューに移る。（測定開始可能）

[測定]

測定に関してはメインメニューの中からBasic fanctionとInterval scanのふたつを選択することができる。Basic fanctionは通常測定を、Interval scanはS/N値を大きくするために、測定中に同一波長におけるCD値について積算（数回CD値を測定し、その平均値をとる。）をし、これを波長が移動するたびごとにくりかえして、最終的なスペクトルを算出するものである。後者のほうがデータ的に正確ではあるが、かなりの測定時間を要するため、測定に応じて測定方法を選択する必要がある。ここでは、Basic fanctionについて説明する。

メインメニューからBasic fanctionを選択すると、上部にMeasure Mathematics Filesというコマンドが現れる。

1. Measure

まず、Parameterというコマンドを選択して、条件設定をする（マニュアルのp.79～83参照）。

次にセルホルダーにセル（試料）をセットした後、Extcuteで測定を開始する。（なお、ここで測定するスペクトルをメモリーの何番に入れるか聞いてくるので、1～8のメモリー番号のうちどれかを入力する。）

固定波長におけるCD値の時間変化について測定したいときは、測定モードの中から、Time Scanを選んで測定を行うこと。（測定方法についてはスペクトル測定と同様。ただし、横軸は波長から時間にかわる。）

Measure中のその他のコマンドについてはマニュアルのp.82～87に書いてあるので、参照のこと。なお、Measureモードでは、ファンクションキーで次のような機能を使用することができる。

f.1 scale ・・・縦軸のスケールを変更することができる。
f.2 cursor ・・・特定波長のCD値と、PMT Vol.を知ることができる。
f.3 overlay・・・スペクトルの重ね書きを行う。
f.6 CH2 on/off・・PMT Vol.の表示切り替え。
f.7 peak ・・・ピーク検出
f.8 plot ・・・プロッターにスペクトルその他を出力する。

プロッターの使い方

プロッターのスイッチ（右横の黄色いボタン）を入れ、紙をセットし、プロッター用のペンをセットする。（紙はふつうのコピー用紙で結構です。）紙にはしわが寄ら

ないように正しくセットすること。このあと、f.8のプロッター出力命令で、プリントアウトします。

2. Mathematics

計算を行うコマンドである。通常、測定時には、ベースライン（溶媒のみのスペクトル）を測定し、その後、サンプルのスペクトル測定を行うが、ベースライン（メモリー1）をサンプルのスペクトル（メモリー2）から差し引く場合、コマンドからArithmeticを選び、2、-、1を順に入力する。計算の結果、算出されたスペクトルは新しいメモリー番号に保存する。

なお、メモリーどうしの計算以外に定数との計算もできる。これは、計算方法（+、-など）を入力した後にメモリーとの計算をするか、定数との計算をするか聞いてくるので、そのときに指示（入力）する。Mathematics中のその他のコマンドについてはマニュアルのp.90～94に書いてあるので、参照のこと。

3. Files

ハード上のメモリーに記憶させているスペクトルをフロッピーディスクにセーブ、もしくはフロッピーディスクにセーブしているスペクトルをハード上のメモリーにロードするコマンドである。それぞれ、Save、Loadで実行して下さい。

[測定した後は・・・]

必ず以下のことを実行して下さい。

1. 本体の電源をPower2、Power1の順に切る。
2. 水を止める。（ランプを消した後に冷却水を流しっぱなしにしていると機械がいたむので注意すること。）
3. 窒素ガスを止める。
4. プリンター、パソコンのスイッチを切る。

§３　装置の仕様

・光源　　450W　Ｘｅランプ　　水冷方式

・分光器

測定波長範囲：　　170-800nm

スペクトル幅：　0.2、0.5、1、2nmの４段階の一定スペクトル半値幅

スリット：手動（0.01～2nmの間で、任意に設定可能）

スキャニングスピード：1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000nm/min

集光装置：微量用円筒セル（200μL）に集光

窒素ガス置換：分光器および試料室内を乾燥ガスにより置換

・試料室

循環水出入口：循環恒温槽およびペルチェ式恒温セルホルダー冷却水用

セルホルダー：円筒型セル用ホルダー
角形セル用恒温セルホルダー（循環恒温槽により温度コントロール）
温度可変式恒温セルホルダー（ペルチェ式、角形セル、微量用円筒セルが使用可能）

・CD性能仕様
変調器：ピエゾエラスティックモデュレータ（50KHz）
検知器：光電子増倍管
CDスケール：±1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000m/フルスケール
RMSノイズ：185nmで0.05、200nmで0.04、500nmで0.05
測定条件　レスポンス：16sec、スペクトル幅：1nm
試料：光路に何もセットせずに測定
ベースラインの安定性：0.2m°/h（30分間ウォーミングアップ後）
レスポンス：0.5、1、2、4、8、16、32、64msec
0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16sec

・UV仕様
測定方式：フォトマル印加電圧から吸光度に変換
測定レンジ：0〜5ABS
測定の正確さ：±0.02ABS

・セル
円筒型石英セル10mm、1mm
微量用円筒セル200μL用
角形セル10mm　（テフロン製蓋つき、専用の撹拌子で撹拌可能）

・コンピュータ　NEC9801　BX2

§４　利用上の注意事項

スペクトルが歪まないように測定するには、スキャンスピードとレスポンスの積がスペクトルの半値幅の1/10以内にする必要がある。スキャンスピードとレスポンスの最適組み合わせは測定方法によって異なるので、説明書の目安を参考にして測定すること。（2-1〜2-12参照）。また、適切な窒素ガス流量を選択すること。

使用するにあたって、必ず備え付けの”使用予約簿”に使用する日時と所属、氏名を書いて下さい。また、使用後は備え付けの”使用記録簿”に、利用した日時と測定時間（Power1,Power2のついている機械に時間カウンターがあるので、測定開始時のカウンター値と、測定終了時のカウンター値を明記し、この値から測定時間を算出して下さい。）氏名、所属、研究室電話番号、測定波長、窒素ガスの流量、使用したセルのセル長と番号を必ず明記して下さい。

§５　応用例

５．１　蛋白質

CDのコットン効果が蛋白質の高次構造を鋭敏に反映することが明らかになって以来、これまでに多くの測定がなされて来ている。ここに、変性による高次構造の変化についてポリ-L-グルタミン酸を用いて測定した例を示す。pH4.3におけるポリ-L-グルタミン酸のCDを400～200で測定すると、225nm付近に負のコットン効果を示し、このピークの大きさが、αーヘリックス含量の目安として用いられる。さらに短波長領域には、強い正のコットン効果が現れる（図３　実線）。ポリ-L-グルタミン酸はpH6以上ではランダムコイルになった状態で存在するため、この効果は著しく変化し、符号の逆点が起こる（図３　点線）。

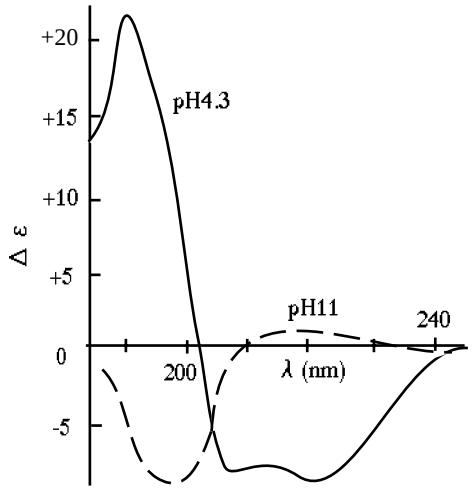


図3　ポリペプチドのCD

５．２　核酸

核酸の構成単位はプリンあるいはピリミジン塩基にD-ribose(RNA)、2`-deoxyD-ribose(DNA)からなるヌクレオシドで、これがリン酸を介して多分子結合してヌクレオチドを形成している。天然ヌクレオチドは右巻き二重らせんを形成し、220～300nmにコットン効果を示す。図４に示すように、エナンチオおよびメソDNAはそれぞれ対応する天然型DNAとは逆および平坦なCDスペクトルを与える。塩基としてシトシン（C）を持つ12量体のエナンチオ-DNA［$(L\text{-}dC)_{12}$のように示す］は対応する天然型DNA［$(D\text{-}dC)_{12}$］の鏡像体である左巻きらせんを形成するため、逆のCDスペクトルを示し、メソDNA｛［(L-dC)(D-dC)］$_6$、以後$(LD\text{-}dC)_6$｝は平坦なスペクトルを与えている。
同様のことが、相補エナンチオ-DNAどうしの等量混合物［$(L\text{-}dC)_{12}$・$(L\text{-}dC)_{12}$］が対応する天然型右巻き二重らせん［$(D\text{-}dC)_{12}$・$(D\text{-}dC)_{12}$］と逆のCDスペクトルを呈することからも示される。

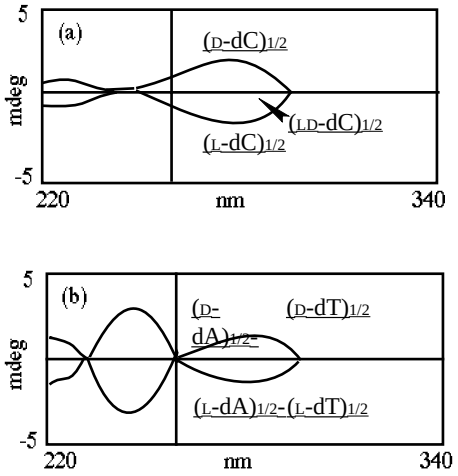


図４　合成したオリゴマーのCDスペクトル
(a)$(L\text{-}dC)_{12}$, $(D\text{-}dC)_{12}$および$(LD\text{-}dC)_{12}$.
(b)$(L\text{-}dA)_{12}$· $(L\text{-}dT)_{12}$および
$(D\text{-}dA)_{12}$· $(D\text{-}dT)_{12}$

ストップトフロー分光光度計
（大塚電子 RA-401）

薬学部　薬品物理化学研究室　森　弘正；内線 4314

§１　はじめに

反応の速度論研究では反応によって起こる物質量の変化を経時的に観測する．物質量の変化は光吸収や蛍光など分光法や伝導度，pHの電気分析法，熱的方法，磁気共鳴法など間接的に検出されることが多い．通常の分光光度計などを使って測定できないような半減期数ミリ秒から数秒の速い反応の経時変化を測定するためにストップトフロー法が用いられる．ストップトフロー法で通常使われる検出法は光吸収や蛍光などの分光法である．

§２　原理

ストップトフロー法は２種の溶液を(i)急速に流れを開始し（ii）混合し，（ii）液の流れを停止し,記録開始（トリガー）信号を送出，（iii）反応セル内で進行する反応に伴う物理量を高速記録する．反応溶液の混合方式にはピストン駆動方式とガス圧駆動方式がある．本装置はガス圧駆動方式で，検出器として光吸収および蛍光検出器を備えている．ストップトフロー装置の概念図を下に示す．

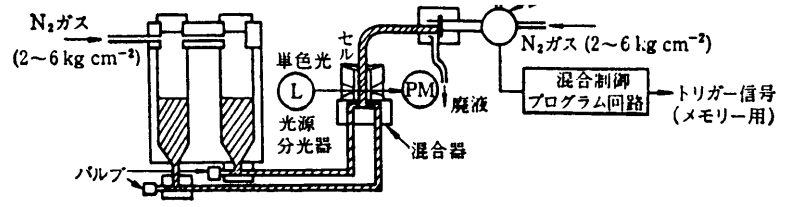
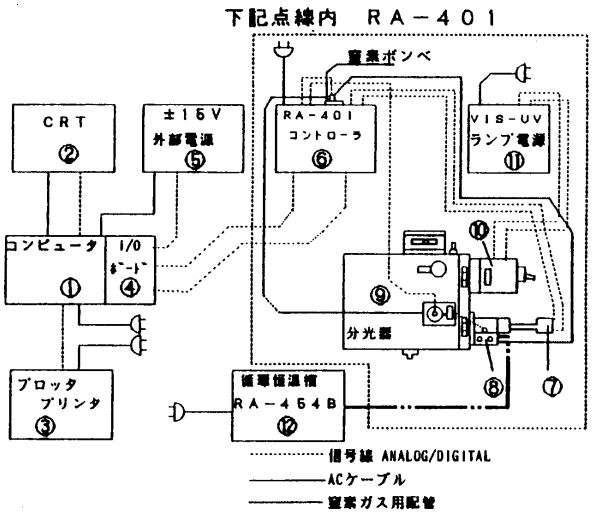


図１　ガス圧駆動方式のストップトフロー装置；流路系の概念図

§３　装置の仕様，付属設備

１）仕様　機種：大塚電子（株）RA 401型ストップトフロー分光光度計
RAコントローラ，ミキシングユニット，検出器(光電子増倍管)，光源，
RA分光器，コンピュータ(PC-9801)，プロッタ(MC-920)，循環恒温水槽
機能：測定波長範囲　200～800 nm
測定感度　0.0004 ΔOD
デッドタイム　約 500 μs（ガス圧　9 kg/cm^2　２mmセル使用）
使用セルとデッドボリウム　２mmセル（29.4 μL）10 mmセル（42.0 μL）

2）構成図



1.データ処理装置（PC-9801）　7.検出器（光電子増倍管PMT）

2.カラーCRT　8.ミキシング・ユニット

3.プロッタ/プリンタ（MC-920）　9.分光器（RA分光器）

4.I/Oボード（UI-020）　10.ランプハウス（VIS-UV）

5.±15V外部電源　11.VIS-UVランプ電源

6.RA-401制御器（コントローラ）　12.循環恒温槽（RA-454B）（オプション）

図２　RA 401型ストップトフロー分光光度計の構成図

本装置は大別して分光測定部（A），試料混合部（B），ＲＡコントローラ（C）およびデータ解析用コンピュータ（D）からなっている．

§４　測定方法

使用上の注意事項と測定手順（4-1．装置の起動，4-2．試料溶液のリザーバへの供給，4-3．試料溶液の追加と交換，4-4．測定，4-5．終了操作，4-6．基本的なデータの処理，の順に）を以下に述べる．なお，測定用セルは２mmと10mmセルが準備されており，通常は２mmセルが装置に取り付けられている．

４-１．装置の起動

1）通常の測定では窒素ガス圧を５ kg/cm^{2}とする

2）ランプ電源のVIS-UV電源スイッチをONにする（光源安定に30分間）

3）コンピュータのメインスイッチをONにし，プログラムディスク(RA-401S)をドライブＡに挿入する（詳しくは「4-4．測定」に記述）

4）RAコントローラ（本体）の電源をONにする
このとき，RAコントローラの各スイッチがつぎの状態にあることを確認する
[OPERATION]　OFF，[FLOW]　MANU，[PRESS]　OFFであるか？
[PM-VOLT]　つまみをL側にいっぱいにまわしてあるか？を確認する

6)　分光器ミラー切り換えレバーをＢ側（蛍光検出の場合はA側）とする
測定する波長によってフィルターを変える
スリット　1.4 mm（必要に応じてスリット幅を変える）

7)　測定波長を設定する（分光部のつまみで設定する）
ランプハウスの切り換えレバー選択：UV (200～350nm)　VIS (350～800nm)
測定波長によって切り換えプレートを選択しセットする

４-２．試料溶液のリザーバへの供給

1）リザーバのストップバルブ (R側とL側) を時計方向に回し閉める
2）[PRESS]スイッチをOFFにする
3）[FLOW]スイッチをAUTO→→MANU→→AUTOの順に切り換える（AUTOの確認）
4）[PRESS]スイッチがOFFになっていることを確認する
5）リザーバーの蓋（L側とR側）を外す
6）試料液をそれぞれリザーバに入れる（L側とR側に同量入れること）
　　{注意} 測定溶液は予めキャビテーションを防ぐためアスピレータなどで十分に脱気しておく
7）リザーバに蓋をする（時計方向に蓋を回しセット）
8）ストップバルブを時計と反対方向に回しいっぱい開く
9）[START]スイッチを数回押し，反応セルに反応後の溶液が満たされた状態にする
10）「４-４．測定」の作業に移る

４-３．試料溶液の追加と交換

［両方のリザーバの試料液の追加と交換］
測定試料の交換を以下の操作によって行なう
Ａ）蒸留水または緩衝液，測定溶液の溶媒で次に示す手順により洗浄する
1）[PRESS]スイッチをONにする
2）[FLOW]スイッチをMANUにする（リザーバに液があるときは液が排出される）
Ｂ）測定溶液を次に示す手順によりリザーバに入れる
1）[PRESS]スイッチをOFFにする
2）ストップバルブを時計方向にまわし閉じる
3）リザーバの蓋を開ける
4）リザーバに等量の試料液を入れる
　　試料の追加：ストップバルブを両方とも閉じ，[FLOW]スイッチをMANU→
　　→AUTOに切り換えた後，[PRESS]スイッチをOFFにしてからリザーバの蓋を開け，試料を入れる
5）リザーバの蓋を閉める
6）ストップバルブ（L側とR側）を開く
7）[PRESS]スイッチをONにする
　　もし，[FLOW]スイッチがAUTOに切り換えてないと試料液はすべて排出されるので必ず[FLOW]スイッチをAUTOにしておくこと
8）測定できる状態となる
［リザーバの一方だけの試料液の追加と交換］
1）交換しない方のストップバルブだけを閉めたのち，[FLOW]スイッチをMANUにする
2）[FLOW]スイッチをAUTO，[PRESS]スイッチをOFFにしてＡ）で述べた方法で交換するリザーバの試料液を排出し蒸留水または緩衝液，測定溶液の溶媒で洗浄

する
3）ストップバルブを閉じ，交換する試料液を少し多めに入れる
4）リザーバの蓋を閉める
5）[PRESS]スイッチをONにする
6）ストップバルブを開ける
7）L側とR側の液量に違いがあるとき，スタートスイッチを押して同じ液量までにする．[DURATION]を小さくすると微調整ができる
8）交換しなかった方のストップバルブを開く
9）測定できる状態となる

［試料液の追加と交換での注意］
1）リザーバの蓋はL側とR側で間違えて取り付けないこと
2）試料量はL側とR側で必ず同量にすること
3）試料を追加するときはストップバルブを必ず閉じて行うこと

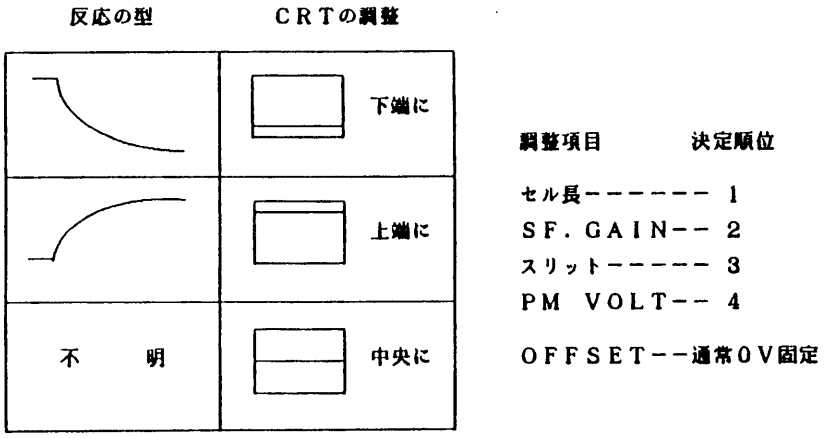
4-4　測定

1）コンピュータは「4-1．3）」で既に立ち上げられており，CRT画面は"How many files (0-15)?"の表示となっている．リターンキーを押す

<初　期　画　面>

```
*****  S T O P P E D   F L O W  *****                    SF [SF-01A]

[0]: T e s t                        [10]: Samp.period        = 300 msec

[2]: M e a s u r e                  [11]: S F - G a i n       = .2 ABU
[3]: M e a s u r e (auto. accum.)
            A c c u m .      =0
                                    [13]: W a v e l e n g t h  = 550 nm
[5]: A c c u m .   c l e a r       [14]: S l i t             = 1.4 nm


                                    [19]: S a v e  condition
[9]: C a l c u l a t i o n          [E] : E n d

Select [0] --- [E] ?
```

2）コンピュータの画面の[0]Testを選択し
3）分光部の波長つまみを回して測定波長をセットし，下部のレバーを左に倒してロックする．[スリット]は1.4 nm とする．RAコントローラの[GAIN]を 1 V/FS にセットする．
4）[OPERATION]スイッチをONにする
5）CRTをみながら[PM-VOLT]つまみをhigh方向へまわしベースラインレベルを吸光度が増加する反応では上側へ，反対の場合は下側へくるようにフォトマルチプライヤーの印加電圧を調節する
6）作業が終了したら[SPACE]バーを押し初期画面に戻る
7）データ解析コンピュータで[２]または[３]を入力すると次の画面が表示される
[３]では加算平均する回数を入力する



8）保存したいチャンネル番号を入力すると，"Sample name ?＿＿＿＿＿＿と表示されるので10文字までの保存名を入力すると次の画面が表示される
（数字，アルファベット，カナまたは記号で入力できる）

```
*****  S T O P P E D  F L O W  *****                    SF [SF-01A]

[0]: D i s p l a y                    [10]: CH.A + B -> CH.C
                                      [11]: CH.A + CH.B -> CH.C
                                      [12]: CH.A - CH.B -> CH.C
[3]: Y - S c a l e                    [13]: CH.A  <->  CH.C
          = 0 --- .2 ABU              [14]: CH.A (average) -> CH.C

[4]: T i m e   S c a l e              [15]: Smoothing , Differential
                  = 0 --- 300 msec

[6]: W r i t e    d i s k             [17]: L o g   p l o t
[7]: R e a d      d i s k             [18]: Guggenheim  plot
[8]: D e l e t e  d i s k             [19]: C u r v e   f i t

[9]: CH.A ( rename : B ) -> CH.A      [RETURN] : M e n u

Select  [0] --- [RETURN]  ?

CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ    CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ    CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ    CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ
 1                          21                          41                          61
 2                          22                          42                          62
 3                          23                          43                          63
 4                          24                          44                          64
 5                          25                          45                          65
 6                          26                          46                          66
 7                          27                          47                          67
 8                          28                          48                          68
 9                          29                          49                          69
10                          30                          50                          70
11                          31                          51                          71
12                          32                          52                          72
13                          33                          53                          73
14                          34                          54                          74
15                          35                          55                          75
16                          36                          56                          76
17                          37                          57                          77
18                          38                          58                          78
19                          39                          59                          79
20                          40                          60                          80

ＳＡＭＰＬＥ　ＮＯ. ([ RETURN ] : 1   or   1 --- 80 )  ?
```

9）RAコントローラの[START]スイッチを押し，反応を開始する
（測定中は"Trig. Switch"が表示，転送中は"Wait"が表示される）
10) 再び[START]スイッチを押す．濃度変化の曲線が得られる．そのまま測定を終了するか，続けるか，データ保存後終了するか，を聞いてくる
[RETURN]：End　[SPACE]：Next　[4]：Ch. in & End　から選択

通常は，この結果から

記録時間	コンピュータで設定
信号強度	GAIN で変える．目盛り(V/FS)を大きくすると感度が大きくなる
終了後の曲線の位置	[PM-VOLT] で赤色の範囲内で変える
ノイズ	[RESPONSE]で変える．ただし記録時間の 1/100 以下にする
記録の初期の乱れ	[DELAY]で変える．これはバルブ停止命令信号とデータ取り込みトリガー信号の間の遅延時間である
全体の乱れ	[DURATION] で変えられるときもある．これは電磁弁の開いている時間であり，大きくすると試料の消費量が大きくなる

を調節し，最適の結果が得られるまで [End]として一旦戻り，測定波長，SF-GAIN，スリット幅などを入力しなおし，[Next]を選択して測定を繰り返し満足する結果が得られたら[Ch. in & End] を選択する
11）測定結果のデータ処理，フロッピーディスクへのデータの保存，および印刷は「４-６．データの処理と印刷」に記述するので参照する

４-５．終了操作

測定を終了する場合の操作手順を以下に示す
1）プロッタ／プリンタの電源スイッチをOFFにする
2）コンピュータの操作
①CRTに表示された初期画面で，[E]を押す
②フロッピーディスクドライブ装置が点滅し，CRTに”A＞”が表示される
③フロッピーディスクを取り出す
④コンピュータの電源スイッチをOFFにする
3）VIS-UVランプ電源の電源スイッチをOFFにする
4）リザーバおよび光学セル，試料混合器の洗浄およびＲＡコントローラのスイッチの設定
①[PM-VOLT]をＬ方向に回し，ＨＶメーターの表示を0Ｖにする
②[FLOW]スイッチをMANUにする（リザーバ内のサンプルがすべて排出される）
③再び[FLOW]スイッチをAUTOにする

④ストップバルブを両方共閉じる
⑤[PRESS]スイッチをOFFにする
⑥リザーバ蓋を開き，溶媒または蒸留水を５mL入れる
（有機溶媒で洗浄した場合は最後に蒸留水で洗浄する）
⑦リザーバ蓋を閉じる
⑧[FLOW]スイッチをAUTOにした後，MANUに戻す
⑨ストップバルブを両方共開く
⑩ＲＡコントローラの[PRESS]スイッチをONにする（リザーバ内のサンプルが加圧されセル内へ流される）
⑪[FLOW]スイッチをMANUにする（リザーバ内のサンプルがすべて排出される）
⑫③～⑩を2～３回繰り返えし，リザーバ，試料混合器を洗浄する
⑬再び[FLOW]スイッチをAUTOにする
⑭ストップバルブを両方閉じる
⑮[PRESS]スイッチをOFFにする
⑯[FLOW]スイッチをMANUにする
⑰[OPERATION]をOFFにする
⑱ＲＡコントローラの[POWER]スイッチをOFFにする

5）窒素ガスの一次圧，二次圧を止める
6）外部電源ボックスの電源スイッチをOFFにする

４-６．データの処理と印刷

・フロッピーデイスクへの保存と読み込み
・データ保存のチャンネル間の移動とチャンネル間で加減したデータの作成
・log プロット，Guggenheimプロット，Curve Fitなどのデータ処理ができる

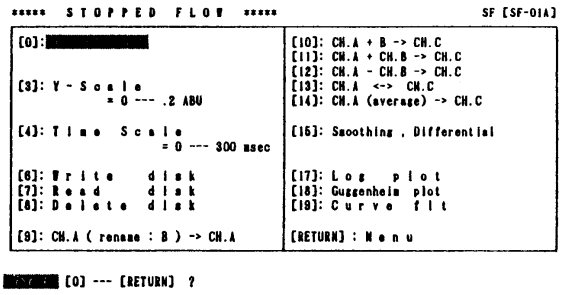
[測定データの読み込みと印刷]

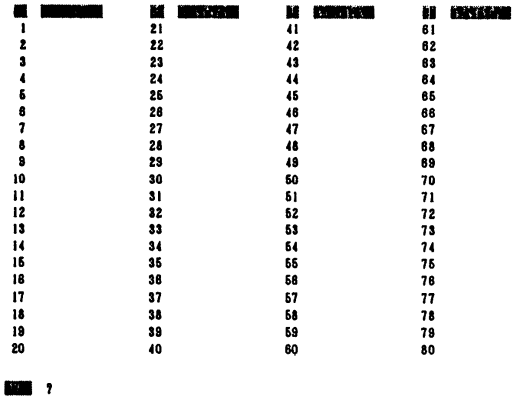
＊読み込んだデータのABUスケールと時間スケールに合わせて測定時のスケールをコンピュータで入力することを忘れずに！

1）初期画面で[9]を選択すると解析演算画面が表示される

```
*****  S T O P P E D   F L O W  *****                    SF [SF-01A]

[0]: D i s p l a y                    [10]: CH.A + B -> CH.C
                                      [11]: CH.A + CH.B -> CH.C
                                      [12]: CH.A - CH.B -> CH.C
[3]: Y - S c a l e                    [13]: CH.A  <->  CH.C
          = 0 --- .2 ABU              [14]: CH.A (average) -> CH.C

[4]: T i m e   S c a l e              [15]: Smoothing , Differential
                  = 0 --- 300 msec

[6]: W r i t e    d i s k             [17]: L o g    p l o t
[7]: R e a d      d i s k             [18]: Guggenheim  plot
[8]: D e l e t e  d i s k             [19]: C u r v e   f i t

[9]: CH.A ( rename : B ) -> CH.A      [RETURN] : M e n u

Select  [0] --- [RETURN]  ?
```

2）[0]を入力するとチャンネルリストが表示される





3）読み込むチャンネル番号を入力する

チャンネル指定は”，(and)”または”－(from to)”，”－”を使って複数同時に読み込める

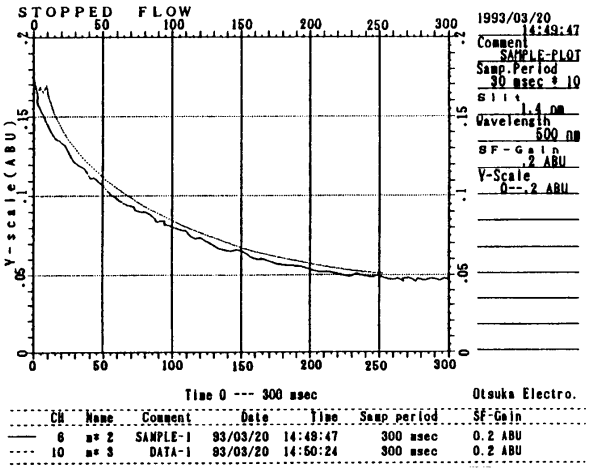
ABUスケールと時間スケールが測定時のスケールと同じであることを確認する．もし違っているときは初期画面に戻り，測定時の[10]SAMPLE PERIOD, [11]SF-GAIN，[13]WAVELENGTH，[14]SLITを入力したのち，[9]を選択し，チャンネルを呼び出す

4）[RETURN] Next　[0] Plot　[1] Copy　[2] Digital　から選択する

印刷は[0]，[1]または [2] を選択するとComment？＿＿＿＿に１５文字以内で入力すると印刷が開始される

もし，コメントを入力せずにリターンキーを押すと＜Calculation＞画面に戻る

［0］プロット出力例



［2］デジタル出力例

CH 6

Sample name	n= 2	Date	93/03/20	Time	14:49:47
Samp.period	20 msec * 10	Slit	1.4 nm		
0 ms	0.1783	80 ms	0.07976	160 ms	0.05525	240 ms	0.04988
10 ms	0.1635	90 ms	0.07379	170 ms	0.05450	250 ms	0.04911
20 ms	0.1421	100 ms	0.06973	180 ms	0.05317	260 ms	0.04839
30 ms	0.1252	110 ms	0.06655	190 ms	0.05188	270 ms	0.04876
40 ms	0.1122	120 ms	0.06286	200 ms	0.05118	280 ms	0.04774
50 ms	0.1008	130 ms	0.06078	210 ms	0.05149	290 ms	0.04782
60 ms	0.09138	140 ms	0.05879	220 ms	0.05090	300 ms	0.04325
70 ms	0.08531	150 ms	0.05693	230 ms	0.04956		

CH 10

Sample name	n= 2	Date	93/03/20	Time	14:50:24
Samp.period	20 msec * 10	Slit	1.4 nm		
0 ms	0.1773	80 ms	0.07836	160 ms	0.05611	240 ms	0.05007
10 ms	0.1651	90 ms	0.07424	170 ms	0.05330	250 ms	0.04387
20 ms	0.1441	100 ms	0.07008	180 ms	0.05357	260 ms	0.04370
30 ms	0.1288	110 ms	0.06600	190 ms	0.05228	270 ms	0.04386
40 ms	0.1123	120 ms	0.06372	200 ms	0.05153	280 ms	0.04868
50 ms	0.1020	130 ms	0.06078	210 ms	0.05057	290 ms	0.04836
60 ms	0.09313	140 ms	0.05868	220 ms	0.05043	300 ms	0.04849
70 ms	0.08540	150 ms	0.05687	230 ms	0.05044		

［測定データのフロッピーデイスクへの保存］

5）フロッピーデイスク(MS-DOSでフォーマット)をドライブＢに入れ[6]を入力する

6）Select (A, B, C, D)　が表示されるので”B”を選択する

7）”File name？”が表示されるので８文字までの名称を入力する

8）チャンネルリストと”No. (write)？”が表示されるので書き込みたいチャンネル番号をキー入力すると書き込みが行われ”Wait !!!”表示の後自動的に＜Calculation＞画面に戻る

9）さらに書き込みたいときはこの作業を繰り返す
10）作業が済んだらリターンすると初期画面に戻る

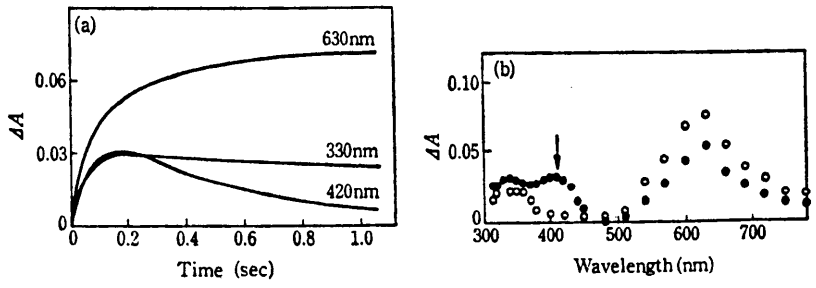
[測定データのフロッピーデイスクからのデータの読み込み]

1）フロッピーデイスクをドライブＢに入れ[7]を入力する
2）Select (A, B, C, D)　が表示されるので ”Ｂ” を選択する
3）”File name？” が表示されるので呼び出すFile nameを入力する
4）チャンネルリストと ”No. (read)？” が表示されるので書き込みたいチャンネル番号をキー入力すると書き込みが行われる
そのままリターンすると＜Calculation＞画面に戻るので,
5）［測定データの読み込み］の2），3）に従ってデータを読み込むとCRT画面に結果が表示される

§５　応用例

金属錯体形成反応，生体高分子の立体構造や酵素反応など高速液相反応の研究に応用される．

還元型セルロプラスミンのO_2による酸化過程での吸収スペクトル変化をストップトフロー法で測定されている．図ａでみられるように420 nmの曲線が0.2秒で極大をしめして減少している．この極大と反応が完結した２秒での吸光度と反応開始直後の吸光度との差DAを波長に対しプロットしたのが図ｂである．　これらの図から420 nmに反応中間体が生じていることが示されている．（T. Manabe, M. Manabe and H. Hatano, *FEBS Lett.*, 23, 268 (1972).）



ストップトフロー法による吸収スペクトル変化の追跡．還元型セルロプラスミンのO_2による酸化過程[50]．（ａ）330, 420, 630 nm における反応曲線（吸収変化）．（ｂ）反応開始より 0.2 sec（●）および 2 sec（○）後におけるスペクトル変化，矢印は反応中間体の吸収極大を示す．その消長は（ａ）の 420nm の曲線で示される．反応条件：セルロプラスミン 1.47×10^{-5} M, O_2 1.20×10^{-4} M, pH 5.5, 25℃.
文献 50 (North-Holland Publishing Co.) より．

図３ストップトフロー法による還元型セルロプラスミンの酸素による酸化過程の測定

参考書

1）廣海啓太郎：酵素反応解析の実際，講談社サイエンティフィック，1989.
2）大野素徳，崎山文夫，高橋健治：酵素実験法Ⅰ，広川書店，1993.
3）大塚電子（株）ストップトフロー分光光度計取扱説明書から基本的測定方法を

まとめた.